Photochemische Reaktionen der Flavingruppe

INAUGURALDISSERTATION

zur

Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie

vorgelegt der

Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Basel

von

Wolfram H. Walker

aus Urach/Deutschland

1967

Druck: PAUL JLLG Photo-Offsetdruck, Stuttgart

Photochemische Reaktionen der Flavingruppe

INAUGURALDISSERTATION

zur

Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie

vorgelegt der

Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Basel

von

Wolfram H. Walker

aus Urach/Deutschland

1967

Genehmigt von der Philosophisch-
Naturwissenschaftlichen Fakultät
auf Antrag der Herren

PD Dr.P. Hemmerich und Prof. Dr.S. Fallab

Basel, den 27.6.67

Prof. Dr. H. Huber
Dekan

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Meinen Eltern

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546022_0038

INHALTSVERZEICHNIS

I. Einleitung 5

A. Vorkommen und biologische Funktion der Flavoproteine 5

B. Struktur und chemische Reaktivität der Flavine 8

1. Flavin als chinoides, amphoteres Redoxsystem 9

2. Radikalstabilisierung 11

3. Kennzeichnung der Flavoprotein Semichinone 13

4. Photochemie der Flavine 14

a) Riboflavin Photolyse 16

b) Photoreduktion 17

c) Mechanismen von Photoreduktion und Photolyse 18

d) Desoxylumiflavine 19

II. Synthesen (Literaturübersicht) 2o

A. Strukturchemie des Flavinkerns 2o

1. Flavochinon 2o

2. Flavohydrochinon 21

B. Chemie und Photochemie von Arylacetaten 25

III. Eigene Arbeiten 27

A. Spektrophotometrische Untersuchung der Photoreduktion von Azachinonen durch Arylessigsäuren 27

1. FMN 27

2. Arylessigsäuren und Analoge 32

3. Phenylacetat und Azachinone 35

B. Präparative Methoden 36
1. Photoalkylierungsprodukte aus Lumiflavin und Arylessigsäuren 36
a) Ausführung und Aufarbeitung 36
b) Charakterisierung der Alkylierungsprodukte 38
c) Alkylierung der Photoprodukte 44
2. Photoprodukte in aprotischem Milieu 45
C. Oxidation der Photoflavine 45
1. 4a-Benzyl-4a,5-dihydrolumiflavine 45
2. 5-Benzyl-flavohydrochinone 46
3. 5-alkylierte Semichinone 47

IV. Theoretische Ergänzungen 52
A. Zur irreversiblen Photoreduktion 52
B. Strukturen reduzierter Flavine 54

V. Experimenteller Teil 56
A. Zur Dünnschichtchromatographie 56
B. Spektren 56
C. Schmelzpunkt, Elementaranalyse 57
D. Gaschromatographie 57
E. Apparatur der Photosynthese 58
F. Synthesen 59

VI. Literaturverzeichnis 72

VII. Zusammenfassung 7o

Curriculum vitae 75

I. Einleitung

A. Vorkommen und biologische Funktion der Flavine

Flavin ist der Trivialname für die chromophore, redoxaktive, prosthetische Gruppe einer in Tier- und Pflanzenreich weit verbreiteten Klasse von Atmungs-Enzymen, der Flavoproteine [1][2][3].

Die Flavoproteine können in zwei Hauptgruppen eingeteilt werden: Metallhaltige und metallfreie Flavoproteine [4].

Die metallhaltigen Flavoproteine nehmen in der mitochondrialen Atmung eine wichtige Stellung ein: NADH als Substrat wird von einem Flavoprotein in einem Zweielektronenschritt dehydriert unter gleichzeitiger ATP-Synthese. Eine ähnliche Dehydrierungsreaktion findet zwischen Succinat und einem Flavoprotein statt.

Die übernommenen Zweielektronen- Aequivalente werden als Einzel-Elektronen in das Cytochrom-System transferiert, wo sie unter gleichzeitiger ATP- Synthese, vermutlich in einem 4e- Schritt, auf den molekularen Sauerstoff übertragen werden.

Die Flavoproteine der Atmungskette enthalten Eisen und einige andere zusätzlich Molybdän als essentiellen Cofaktor, z.B. Xanthin-Oxidase.

In keinem Fall ist es bisher gelungen Eisen aus Eisenflavoproteinen ohne irreversible Desaktivierung abzutrennen.

Auf Grund der ESR- Relaxation des Flavosemichinons in metallfreien und metallhaltigen Flavoproteinen ist heute sichergestellt, dass Eisen und Flavin zum gleichen aktiven Zentrum gehören und miteinander in direktem Kontakt stehen [5].

Metallfreie Flavoproteine Tabelle 1

Im Gegensatz zu den Pyridin-Nucleotid-abhängigen Enzymen dehydrieren Flavoproteine nur solche Substrate, die aktive X-H Bindungen besitzen, z.B. reduzierte Pyridin-Nucleotide, α-Amino-, α-Hydroxy-Säuren, Aldehyde, Succinat und Dihydroliponamid.

Flavoproteine können mit diesen Substraten in einem Zweielektronenschritt reagieren, welcher offenbar metallunabhängig ist.

Ob diese Elektronen nun entweder gleichzeitig, oder aber nacheinander (als Radikalelektronen) weitergegeben werden, hängt von einer Stabilisierungsmöglichkeit der halbreduzierten Stufe des Flavins ab.
Diese Radikal-Stabilisierung kann erreicht weden:

1. durch Komplexbildung mit Schwermetallen,
2. durch Kopplung mit einem zweiten Flavinmolekül [2].

Ueber Elektronenakzeptoren von reduzierten Flavoproteinen gibt Tabelle 1 Auskunft. Die natürlichen Akzeptoren sind nur in wenigen Fällen mit Sicherheit bekannt (vergl. Tabelle 1 ———), in anderen Fällen kann der native Akzeptor nur vermutet werden (Tabelle 1 - - -).

Tabelle 1 Metallfreie Flavoproteine

Nr	Name	Herkunft	Koenzym	Substrat	Acceptoren	Semichinon-spektrum
1	Altes Gelbes Ferment [6]	Hefe	FMN	NADPH	Cytochrom c O_2, Methylenblau $K_3Fe(CN)_6$	Typ B (Rot)
2	D-Aminosäure Oxidase[7][8]	Schweine-niere	FAD	D-Aminosäure	O_2	Typ B (Rot)
3	Glucose-Oxidase[9][10]	Aspergillus Niger	FAD	β-D-Glucose	O_2	pH 6,3 Typ A pH 7,6 Typ B
4	Brenztrauben-säure-Oxidase [11]	Lactobacillus delbrueckii	FAD	Brenztrauben-säure	Cytochrom b_1 $K_3Fe(CN)_6$	
5	Lipoyl-Dehydro-genase [13][14]	Schweineherz Ochsenleber	FAD	NADH Dihydrolypoyl-Verbindungen	Lipoyl-Verbindungen, NAD $K_3Fe(CN)_6$ Menadion	
6	NADH-Cytochrom b_5 -reductase[12]	Schweineleber	FAD	NADH	Cytochrom b_5	ähnlich Typ A (Blau)
7	Ferredoxin-NADP-Reduktase [15]	Spinat	FAD	reduziertes Ferredoxin	Cytochrom f, Ferredoxin, NADPH, NADP, NAD	Typ A (Blau)
8	Azotobacter [16] Flavoprotein	Azotobacter	FAD			Typ A (Blau)
9	Oxynitrilase [17]	Mandeln	FAD	Benzaldehyd und HCN		Typ B (Rot)

FMN = Flavin-Mononukleotid
FAD = Flavin-Adenin-Dinucleotid

NAD/NADH = Oxidiertes/Reduziertes Nicotin-Adenin-Dinukleotid
NADP/NADPH = Oxidiertes/Reduziertes Nicotin-Adenin-Dinucleotid-Phosphat

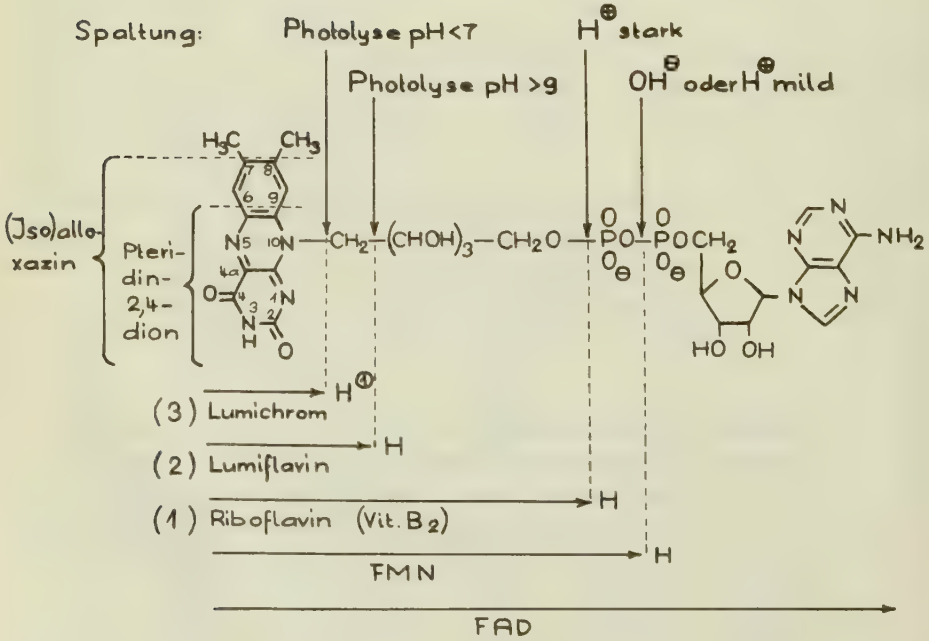
B. Struktur und Reaktivität der Flavine

Die Flavin-Gruppe ist Teil einer nichtproteiden, niedermolekularen Enzymuntereinheit, der Flavocoenzyme und haftet je nach Enzym verschieden am Apoprotein.

Die beiden vorkommenden Flavocoenzyme FMN und FAD sind keine echten Nukleotide, denn das Flavin ist in den Flavocoenzymen nicht glykosidisch gebunden (Schema 1).

Schema 1 Zur Nomenklatur der Flavine

Schema 1



Die saure Hydrolyse führt deshalb auch zum Riboflavin(1) = Vitamin B_2, dem Flavinkern mit Ribityl-Seitenkette und ältesten bekannten Flavin-Derivat [18].

1. Flavin als chinoides, amphoteres Redoxsystem

Lumiflavin(2)(= 7,8,1o-Trimethyl-isoalloxazin)*, (Abschnitt IB,4), ist der einfachste Vertreter der Flavine und unterscheidet sich nicht wesentlich in Spektren, Säuren-Basen- und Redox-Eigenschaften von den Flavocoenzymen.

Die Oxidoreduktion des Flavins ist thermodynamisch reversibel, gleich ob ein oder zwei Elektronen transferiert werden. Damit erfüllt das Flavin die Kriterien eines chinoiden Redoxsystems.
Somit ist eine Differenzierung in drei Flavin-Oxidationsstufen möglich, wobei jede Stufe für sich amphoter ist. (Schema 2)
Flavochinon ist die oxidierte, Flavosemichinon die radikalische** und Flavohydrochinon die vollständig reduzierte Form des Flavins.

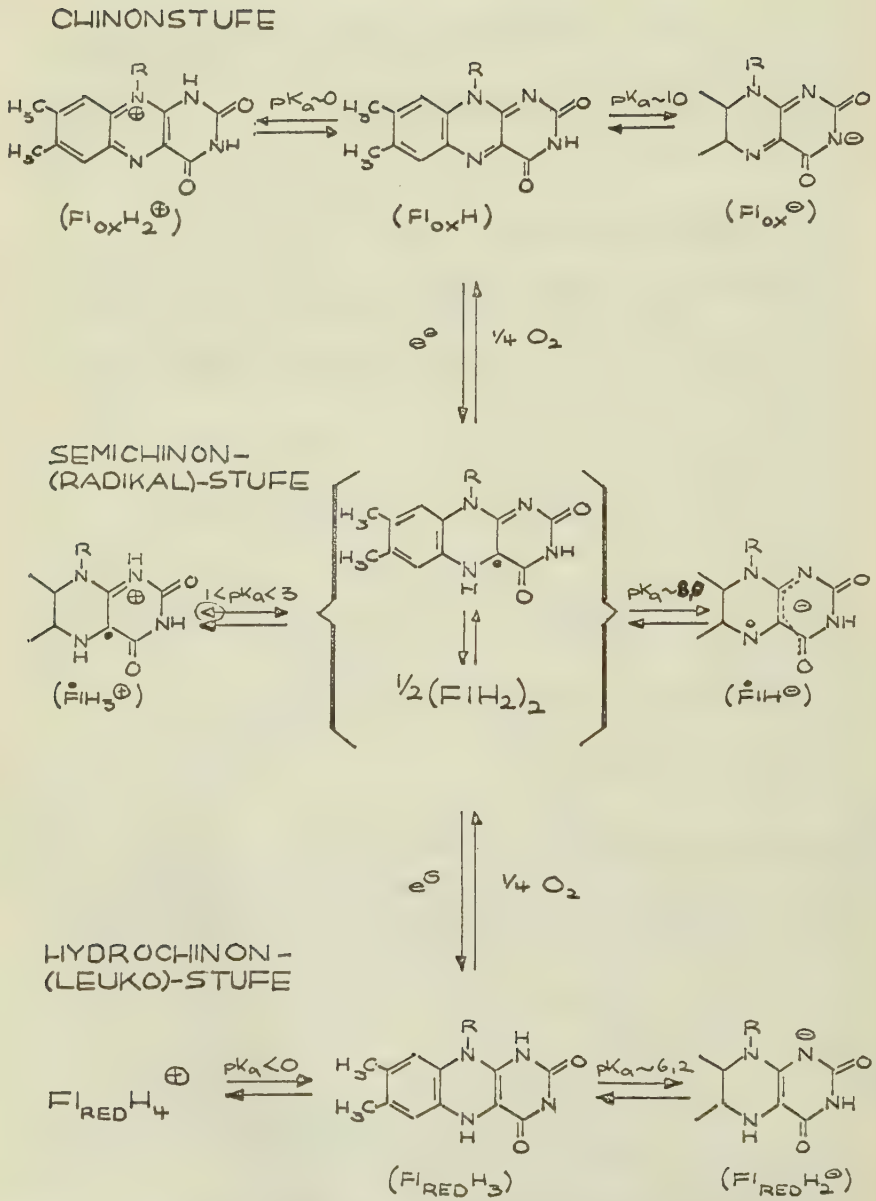
Tautomerenstrukturen

Die Lage der Carboximid-Iminol-Tautomeriegleichgewichte in den verschiedenen Flavin-Redoxstufen wurde durch Vergleich der IR-,UV- und sichtbaren Spektren, sowie der pK_a-Werte der O- und N- alkylierten Flavine untersucht[19] (vergl. dazu Abschnitt IIA).

---

* = 1o-Methyl-2,3,4,1o-tetrahydro-benzo[g]-pteridin-2,4-dion

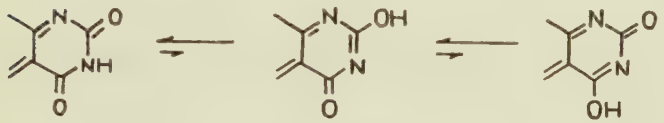
** vergl. Abschnitt IB,3.



Schema 2 Das Flavin-Redoxsystem. Strukturen der je nach pH und Redox-Zustand vorkommenden Flavin-Spezies.

Daraus wird deutlich, dass übereinstimmend mit dem hohen Energie-Inhalt* der Flavochinon-Iminolester das Flavin in der Chinonstufe praktisch vollständig in der Carboximid-Form(4) vorliegt [2o].

(4)



Demgegenüber lassen die Eigenschaften der Flavohydrochinon-Iminolester (vgl. Abschnitt IIA) schon eine merkliche Beteiligung der Iminolformen im Gleichgewicht der Hydrochinonstufe erwarten [2o].

2. Radikalstabilisierung

Besonderes Interesse gilt der Radikalstufe, weil eine Stabilisierung des Semichinons entscheidend für den Mechanismus der Zerlegung von Zweielektronen-Aequivalenten in Einzelelektronen ist.

---

* "energiereich" bedeutet hier Hydrolysen-Energie oder Prototropie-Energie.

In chemischen Modellsystemen wird die Untersuchung dieser Radikale erschwert infolge ungünstiger Lage des Dispropionierungsgleichgewichtes:

$$2\ \dot{F}lH_2 \rightleftharpoons Fl_{Ox}H + Fl_{Red}H_2$$

Das von Hemmerich [21] acidimetrisch und Ehrenberg [22] ESR- spektrometrisch nachgewiesene Disproportionierungsmaximum liegt bei pH 8. Dagegen zeigen pH- Titrationen halbreduzierter Flavinlösungen in Gegenwart von nichtoxidierenden d-Metallionen eine Umkehrung der Disproportionierung unter Freisetzung zusätzlicher Protonen [21] und Bildung charakteristisch gefärbter Radikalchelate:

$$Fl_{Red}H_2^- + Fl_{Ox}H + 2M^{2+} = 2[M\dot{F}lH]^+ + H^+$$

Dies ist schematisch in Fig.1 dargestellt.

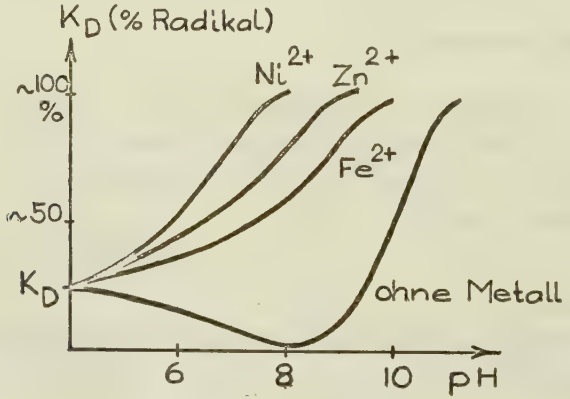


Fig. 1

Ueberdies konnte von Hemmerich et al [23] gezeigt werden, dass das Flavochinon spezifische Metallaffinität zu Donormetallionen zeigt (Ag^+, Cu^+, Fe^{++}, Cd^{++}), unter Ausbildung von Ladungstransferchelaten. Infolge dieses Ladungstransfers nimmt der Flavochinon-Ligand semichinoiden Charakter an:

$$FlCu = [\bar{F}l_{Ox}Cu^+ \longleftrightarrow \dot{F}l^{2-}Cu^{2+}]$$

3. Kennzeichnung der Flavoprotein-Semichinone

Massey und Palmer konnten 1966 durch Reduktion von Flavoproteinen mit Substrat, sowie auch durch anaerobe Photoreduktion mit EDTA zeigen, dass sich alle ESR-aktiven Flavoprotein- Semichinone in zwei Klassen einteilen lassen (Tabelle 1) [24][55]:

1. Typ A, Neutrales Radikal, sogenanntes "Blaues Radikal", mit λ_{max} 57o und 62o nm.
2. Typ B, Anion- Radikal, sogenanntes "Rotes Radikal", mit λ_{max} 48o - 49o nm.

Bei der Glucose-Oxidase (Tabelle 1, Nr.3) wurden sogar je nach pH beide Radikal-Typen gefunden.

Ehrenberg, Müller und Hemmerich konnten als erste die Zuordnung für Rotes Radikal = Anion-Radikal (Typ B) durch Modellversuche bestätigen [25]:

3-alkyliertes Lumiflavin [(2), H3= CH_2COO^-] ergab in der Semichinonstufe in DMF mit starken Basen (z.B. t-BuOK) loo % Ausbildung des Flavosemichinon-Anions (ESR), pK= 8,4 , mit einem Lichtabsorptionsspektrum identisch dem des Radikal-Typs B. (Fig. 2)

Wie aus Figur 2 ersichtlich (Seite 15), muss aber für den Typ B als Modellradikal das neutrale O,O-dialkylierte Lumiflavin-Semichinon in die Betrachtung einbezoben werden [25].

Die Zuordnung des 2. Flavoprotein-Radikaltyps, Typ A, Blaues Radikal = Neutralradikal, ist durch die Untersuchung der Photoprodukte dieser Arbeit möglich geworden (vergl. Abschnitt IIIC).

4. Photochemie der Flavine

Grundsätzlich muss in der Flavin-Photochemie unterschieden werden zwischen zwei Möglichkeiten [3]:

a) Reaktion in Abwesenheit von äusseren Elektronendonatoren (= Photolyse oder Photobleichung*) und

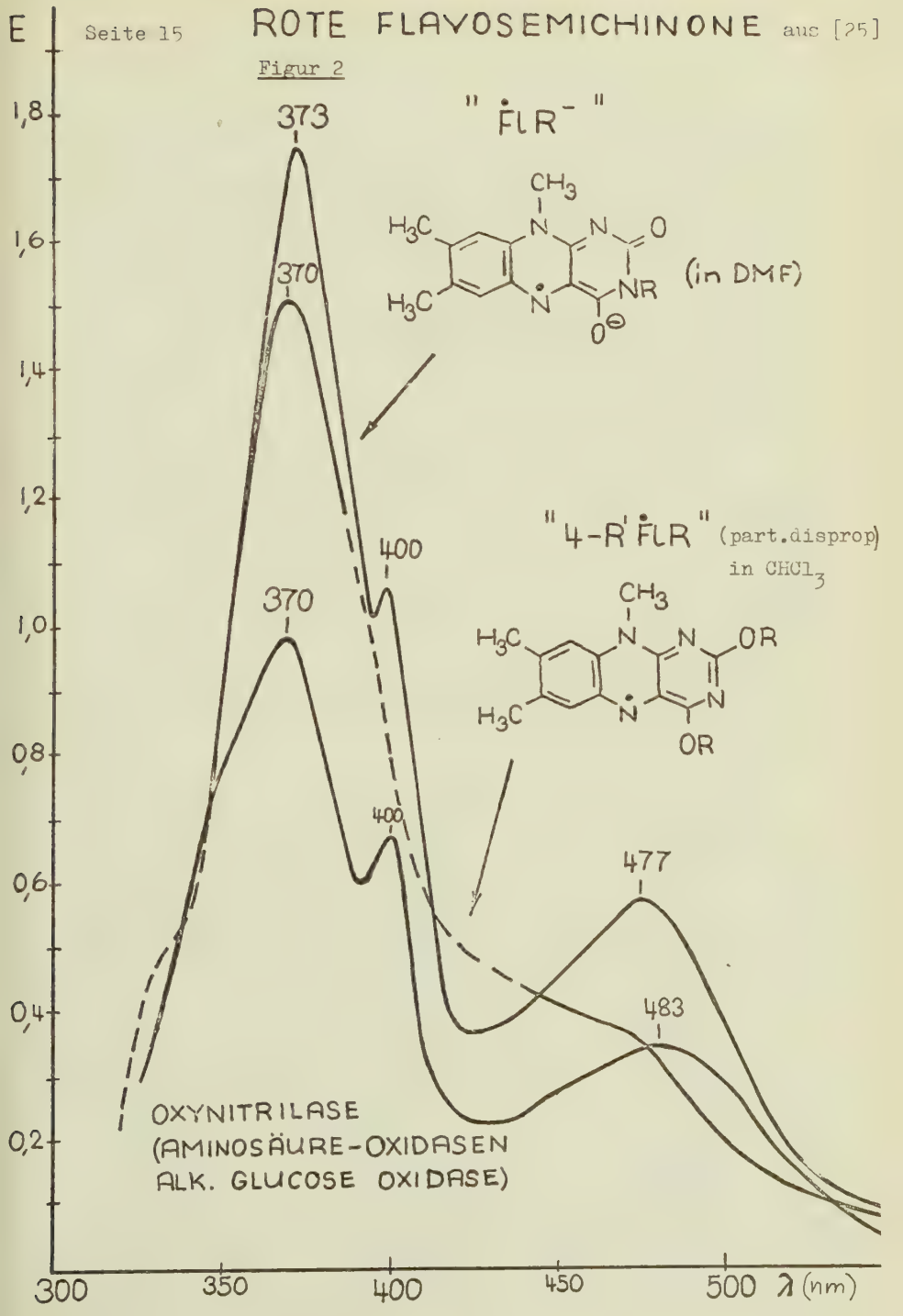
b) in Gegenwart von Elektronendonatoren (= Photoreduktion).

---

* analog zum englischen "photobleaching".

ROTE FLAVOSEMICHINONE aus [25]

Figur 2



a) Photolyse

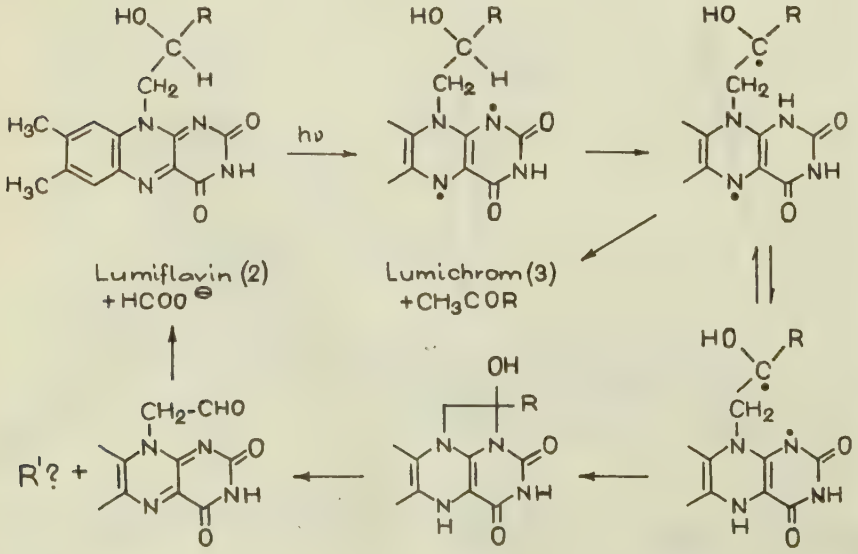
Anaerobe wässrige Lösungen von Riboflavin(1) bleichen beim Belichten mit UV- oder sichtbaren Licht aus, bilden aber bei Luftzutritt fast loo% ig das Ausgangsspektrum zurück.

Zwei divergierende Mechanismen wurden vorgeschlagen: Nickerson [26] und Vernon [27] postulieren eine flavinkatalysierte Wasserspaltung:

$$FMN + H_2O \quad = \quad FMNH^{\bullet} + OH^{\bullet}$$

Demgegenüber konnten die Arbeitsgruppen um Moore und Spence [28], Metzler [29] und Holmström [3o] eindeutig zeigen, dass es sich bei der Photolyse um eine intramolekulare Disproportionierung am Flavin-Triplett (Abschnitt 4c) handelt, wobei die Ribitylseitenkette oxidiert und der Isoalloxazin-Kern reduziert wird (Schema 3) [2].

Schema 3 Riboflavin Photolyse



Ein kinetischer Isotopeneffekt bei der Photolyse von [2',2'-$^2H_2$]lo-(2'-hydroxyäthyl)-Isoalloxazin zeigt, dass im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt eine H-Abstraktion bei der 2'-CH- Gruppe erfolgen muss [28].

Während wässrig neutrale oder wässrig methanolische Photolyse von Riboflavin(1) Lumichrom(3) bildet (= Lumichromabbau), führt die Photolyse im Alkalischen zu lo-Methylisoalloxazin =Lumiflavin(2) (Lumiflavinabbau) (Schema 3).

Obwohl der Wasserstoff in 2'-Stellung bei weitem die günstigste Position für eine Abstraktion darstellt, wurde gezeigt, dass auch ω-Hydroxyl-Ketten mit 3-6 C-Atomen reagieren und zwar in der Reihenfolge 3>5>6>4 [31].

b) Photoreduktion

Anaerobe Photoreduktion der Flavine in Anwesenheit von Elektronendonatoren wurde in den letzten Jahren aufgefunden.
So sind die Photo-Reaktionen von FMN und Riboflavin mit EDTA, NADH [32], Methionin [33], sowie diversen Aminen und Aminosäuren beschrieben [34].

Die Stöchiometrie der EDTA-Reaktion ist noch unbekannt, doch wurde gezeigt, dass neben Formaldehyd pro Molekül photoreduziertes Flavin ein Molekül Glyoxylsäure, aus NADH NAD und aus Methionin Methional entsteht.
Folgende Reaktion wurde z.B. mit Sarcosin auf Grund von Isotopen-Markierungen gefunden; Ausbeute zu 38 %, bezogen auf O_2-Verbrauch.

$$FMN + CH_3NHCH_2COOH + H_2O = FMNH_2 + CH_3NH_2 + CH_2O + CO_2$$

$$FMNH_2 + O_2 = FMN + H_2O_2$$

FAD zeigt gegenüber FMN und Riboflavin mit EDTA eine geringere Geschwindigkeit der Photoreduktion. Dies wird durch das "self-quenching"* des angeregten Flavinzustandes erklärt, bei dem Flavin und Adenin einen intramolekularen Komplex bilden [32]. Dies steht in Uebereinstimmung mit der geringeren Fluoreszenz von FAD gegenüber FMN [21].

Zwar könnte vermutet werden, dass bei der Photoreduktion vonFMN und Riboflavin auch teilweise die Ribityl-Seitenkette dehydriert wird. Von Radda und Calvin wurde jedoch gezeigt, dass die Quantenausbeute der Photolyse (I= o,oo6) lo- bis 5o-fach geringer ist, als diejenige der Photoreduktion; z.B. EDTA I= o,o6 und NADH I= o,25 [32].

Das bedeutet: Ein Überschuss von Elektronendonatoren bezogen auf das Flavin verhindert nicht nur die Flavin-Photolyse, sondern im Gegenteil schützt die Ribityl-Seitenkette vor intramolekularer Dehydrierung.

Bei all diesen Photoreduktionsversuchen wurde jedoch nie eine irreversible Photoreduktion beobachtet.

c) Mechanismus der Photolyse und Photoreduktion

Hier zeigen Photolyse und Photoreduktion gewisse Aehnlichkeit.
Kollisionstheoretische Berechnungen lassen vermuten, dass die photochemisch aktive Spezies eine Lebenszeit von 10^{-4}- 10^{-3} sec hat [35]. Bereits geringe Mengen von KJ (ca 10^{-6}m), genauso wie der Zusatz von paramagnetischen Jonen, vermindert die Quantenausbeute der Photoreduktion, während das Quenching der Flavin-Fluereszenz ca 10^{-4} Mole erfordert.

---

* quencher = Löscher

Es ist somit klar, dass das angeregte Singlett-Flavin* zu kurzlebig ist, um reaktiver Partner zu sein, deshalb nimmt wahrscheilich das Flavin-Triplett am geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Photoreaktion teil [36][37].

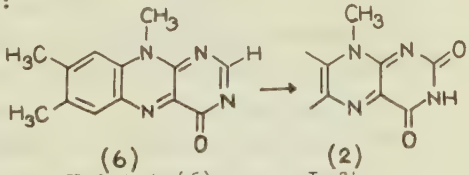
Gleichzeitig ist einleuchtend, dass Flavin-Radikale im langsamen Schritt teilnehmen können, weil ihre Lebensdauer ~~zeit~~ auch in der Grössenordnung von 10^{-3} sec sein kann.

Holmström konnte bei der Photoreduktion von Riboflavin zeigen, dass das Triplett im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt teilnimmt und dass die Reaktion in zwei Einzelelektronenschritten weiterläuft [3o].

Flavin-Tripletts konnten bereits bei tiefen Temperaturen ESR-spektroskopisch gemessen werden [38][39][4o], wobei eine ähnliche Spinverteilung wie beim Flavo-Semichinon gefunden wurde.

d) Desoxyflavine

Bei der Synthese 2- und 4-ständig variierter Lumiflavine (vergl. Abschnitt IIA) erhielten wir früher, ausgehend vom 2-Thio-lumiflavin(5), das 2-Desoxy-lumiflavin(6)[41]. Wie erwartet lässt sich (6) zum Lumiflavin(2) oxidieren. Der Uebergang von (6) nach (2) stellte sich jedoch als Photooxidation heraus [41]:



In wässriger Lösung unterhalb pH 9 ist (6) gegen Luft relativ beständig. Werden aber aerobe Lösungen von (6) mit Tageslicht belichtet, so zeigt sich spektrophotometrisch nach Minuten eine quantitative Lumiflavinbildung(2)

---

* Vergleiche dazu auch das Jablonski-Schema der Phosphoreszenz von Riboflavin in [3o, Seite 33o].

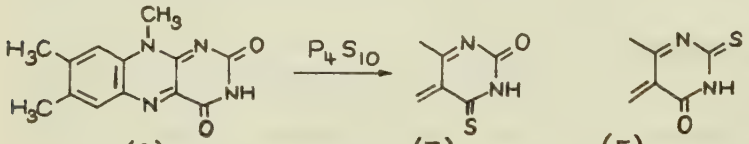
II. Synthesen Uebersicht

A. Strukturchemie des Flavinkerns

Die Chemie der Alloxazine und Isoalloxazine ist drastisch verschieden in den drei miteinander in thermodynamischem Gleichgewicht vorkommenden Redox-Stufen [2].

1. Flavochinon

Der nukleophile Angriff am Flavochinon führt nicht zu Substitution; nur die Synthese von 4-Thio-flavinen(7) mit P_4S_{10} bildet scheinbar eine Ausnahme, hier findet jedoch zunächst eine Reduktion statt [43].



(2) (7) (5)

Nukleophile Substitutionen sind aber beim Flavochinon möglich, wenn die 2- oder 4-Stellung vorher aktiviert wurde. Dies kann geschehen durch:

1. Indirekte Alkylierung des Carbonyl-Sauerstoffs unter intermediärer Bildung von aktiven Iminolestern (Abschnitt IIA,2).
2. Der nukleophile Ersatz des "aktiven" Schwefels in 2-Thio-(5) und 4-Thio-flavinen(7) [26].

Elektrophile Substitution, z.B. die basenkatalysierte Alkylierung des Flavochinons, erfolgt immer in N3-Position.

2. Flavohydrochinon

Alkylierungsreaktionen von Flavohydrochinonen sind wie beim Flavochinon beschränkt durch drei Nebenreaktionen:

2.1. Unter basischen, solvolytischen Bedingungen tritt irreversible Oeffnung des Pyrimidinringes ein [43].

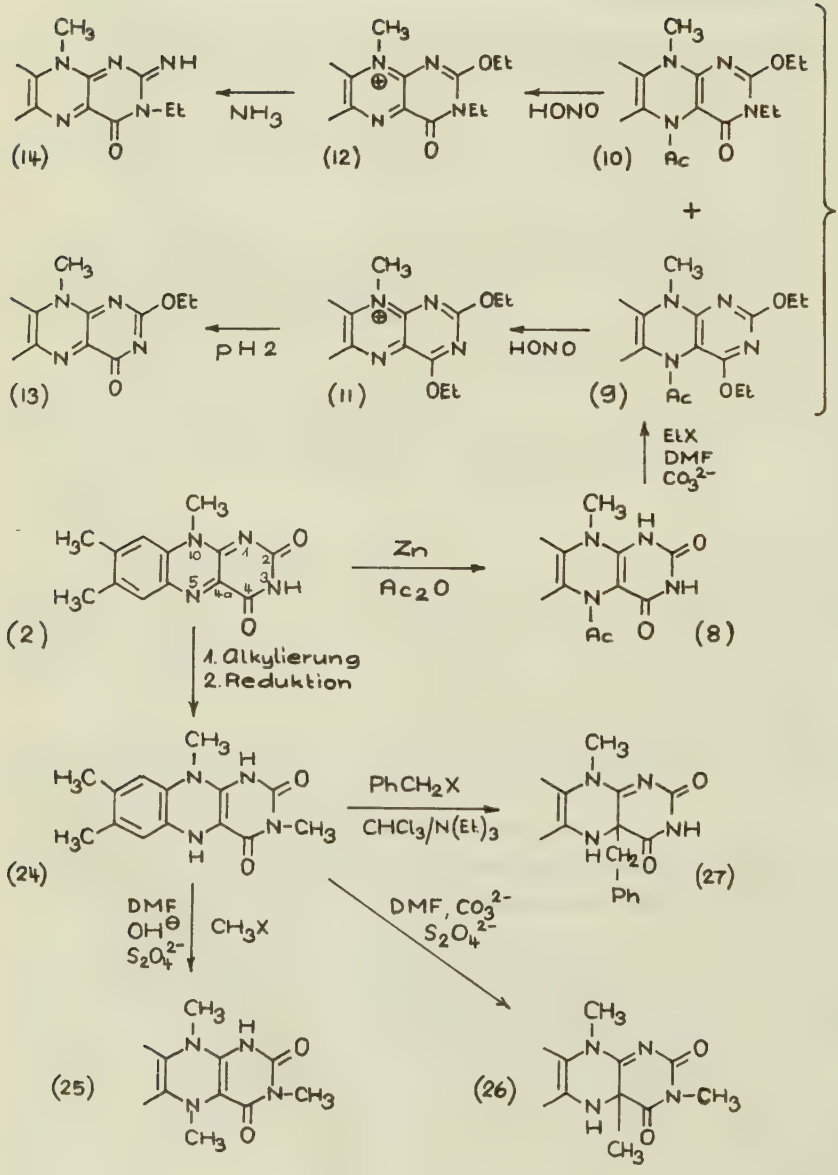
2.2. Mit starken Basen unter nicht solvolytischen Bedingungen (t-BuOK/DMF) oder mit schwachen Basen in der Wärme erfolgt Dimerisierung an der reaktiven 8-Methylgruppe [44].

2.3. lo-Dealkylierung unter Bildung von Lumichrom(3) tritt dann auf, wenn bei Abwesenheit einer 8-Methylgruppe keine irreversible Dimerisierung erfolgen kann [25].

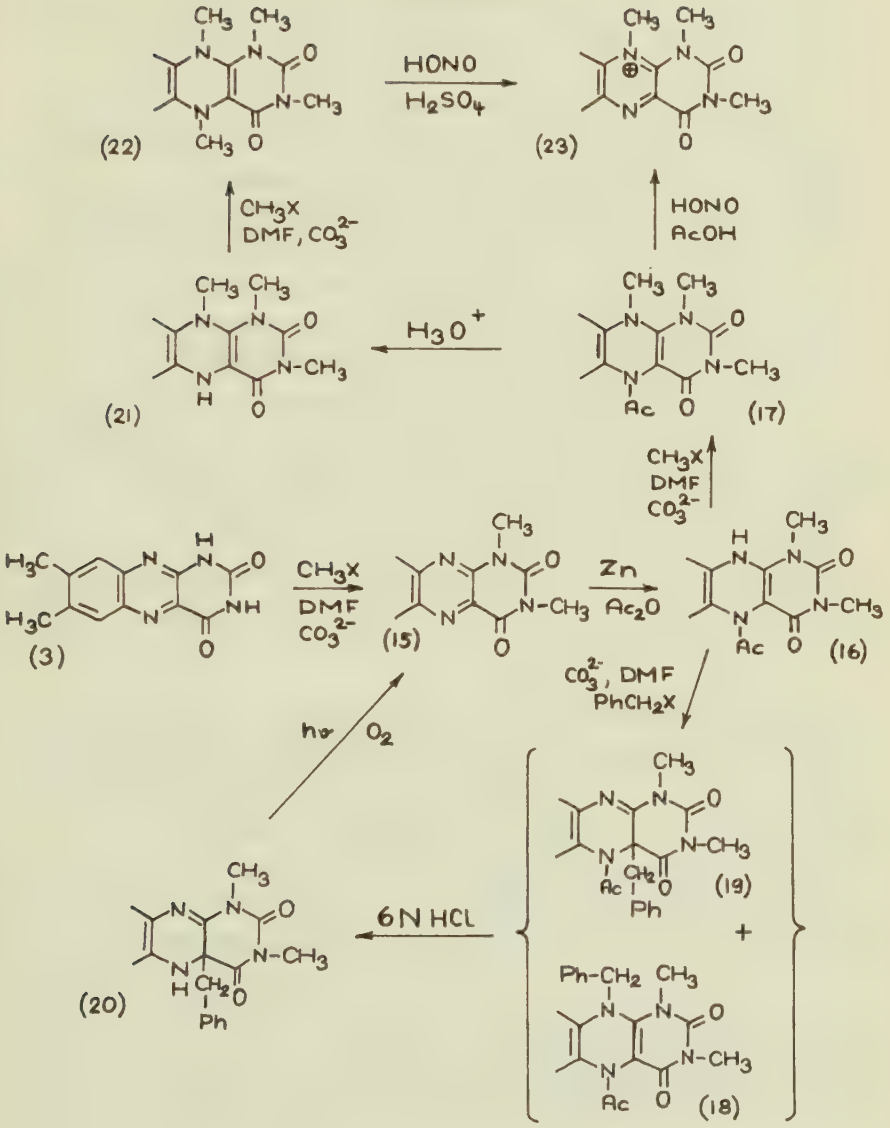
Zur Synthese alkylierter Flavohydrochinone bieten sich drei Reaktionswege (Schema 4 und 5):

α) Ausgehend vom stabilen 5-Acetyl-flavohydrochinon(8) sind zwei isomere O,O-Dialkyl-(9), bzw O,N3-Dialkyl-dihydroflavine(lo) erhältlich [45](Schema 4).
Die selektive Dealkylierung unter oxidativen Bedingungen führt zu den O,O- und O,N-Dialkyl-flaviniumsalzen(11) und (12), wobei es die Oxidation mit HONO erlaubt die Radikalstufe schnell und verlustlos zu überspringen, bevor noch das elektrodefiziente Kation hydrolytische Reaktionen eingehen kann. Die Verseifung dieser Flaviniumsalze (11) und (12) führt zu den Iminolestern(13), bzw. mit NH-Basen zum 2-Alkyl-iminoflavin (14) [45].

Schema 4


NH3
HONO
HONO
pH 2
ElX
DMF
CO3 2-
Zn
Ac2O
1. Alkylierung
2. Reduktion
PhCH2X
CHCl3/N(Et)3
DMF
OH⊖
S2O4 2-
CH3X
DMF, CO3 2-
S2O4 2-
(14)
(12)
(10)
(13)
(11)
(9)
(2)
(8)
(24)
(27)
(25)
(26)

Schema 5


HONO
H_2SO_4
(22)
(23)
CH_3X
DMF, CO_3^{2-}
HONO
AcOH
H_3O^+
(21)
(17)
CH_3X
DMF
CO_3^{2-}
(3)
CH_3X
DMF
CO_3^{2-}
(15)
Zn
Ac_2O
(16)
CO_3^{2-}, DMF
$PhCH_2X$
hν
O_2
6N HCl
(19)
+
(18)
(20)

β) In Stellung 1 alkylierte Flavohydrochinone lassen sich ausgehend von den Alloxazinen (3) und (15) über deren reduktive Acetylierung [(16)] durch nachträgliche Einführung des 1o-ständigen Substituenten erhalten. (Schema 5, Reaktionsschritte (3) bis (17)).
Dagegen führt die Benzylierung in DMF/K_2CO_3 des 1,3-Dimethyl-5-acetyl-dihydrolumichroms(16) nicht ausschliesslich zu 1o-Substitution, sondern zu einem Gemisch von 1,3-Dimethyl-5-acetyl-1o-benzyl-flavohydrochinon(18) und 1,3-Dimethyl-4a-benzyl-5-acetyl-4a,5-dihydrolumichrom(19). Beide Isomeren gehen bei Deacetylierung mit 6M HCl/EtOH in 1,3-Dimethyl-4a-benzyl-4a,5-dihydro-lumichrom(2o) über.*
Dagegen liefert die Verseifung von 1,3-Dimethyl-5-acetyl-lumiflavo-hydrochinon(17) das stabile 1,3-Dimethyl-5NH-lumiflavohydrochinon(21), welches dann zum 1,3,5-Trialkyl-lumiflavohydrochinon(22) weiterreagiert, oder sich aber zum stabilen 1-alkylierten Flaviniumsalz(23) oxidieren lässt [45].

γ) Ausgehend vom 3-Methyl-1,5-Dihydro-lumiflavin(24) (Schema 4) konnte dagegen durch Methylierung je nach Reaktionsbedingung entweder ein 5-Methyl-flavohydrochinon (25) oder aber das isomere 3,4a-Dimethyl-4a,5-dihydro-lumiflavin(26) erhalten werden.** Dagegen scheint die elektrophile Substitution mit Benzylhalogenid ausschliesslich zum 4a-Benzyl-4a,5-dihydroflavin (27) zu führen.**

---

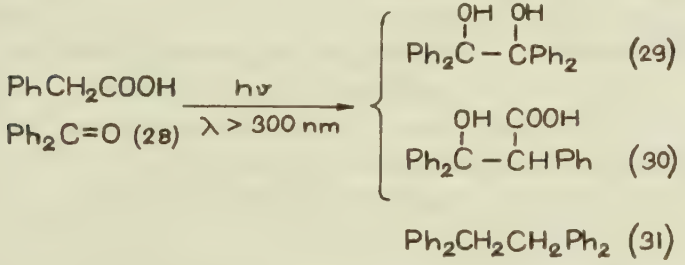
* C.R.E. Jefcoate, persönliche Mitteilung

** F.Müller und P. Hemmerich, persönliche Mitteilung

B. Chemie und Photochemie von Arylacetaten

In der Chemie der Phenylessigsäure tritt unter oxidativen oder photolytischen Bedingungen die Labilität der Carboxylgruppe hervor. So entsteht durch Oxidation vonPhenylessigsäure in verd. H_2SO_4 mit MnO_2 neben CO_2, Benzaldehyd, Benzoesäure und Ameisensäure [46]. Analog bildet sich bei der anodischen Oxidation von Phenylessigsäure, Benzaldehyd und Benzoesäure [47] und durch Oxidation mit Cobalt III Benzaldehyd zu 90%, vermutlich über ein Benzylradikal [48]. Dagegen konnte bei "mehrmonatiger Sonnenbelichtung" von Benzophenon(28) und Phenylessigsäure in Benzol neben CO_2 und Benzpinakol(29) noch α,β,β-Triphenyl-β-Hydroxy-propionsäure(30), jedoch kein Dibenzyl(31) isoliert werden [49]. (Schema 6)

Schema 6



In einer neuen Modelluntersuchung wird derzeit die Photoreduktion zwischen Benzophenon und Phenylessigsäure bzw Phenylacetat in wässrigem Acetonitril verfolgt.*

---

* Ich danke Herrn P. Ringele und Herrn P.D. Dr.P. Schiess für die freundlichen Hinweise.

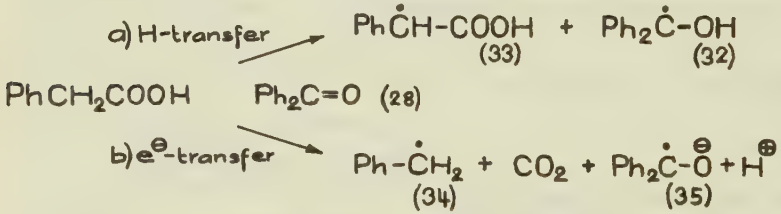
Dabei konnten obige Resultate bestätigt werden. Es zeichnen sich somit folgende Reaktionsschritte ab:

Photoanregung des Benzophenons bei $\lambda > 300$ nm führt zum T_1 (n,π^*) (vergl. [36], Seite 143) als reaktivem Zustand. Daraus können zwei Folgereaktionen resultieren:

Schritt a liefert unter H- Abstraktion ohne Decarboxylierung Ketylradikal(32) und Phenylessigsäureradikal(33);

Schritt b liefert unter e^--Abstraktion und Decarboxylierung CO_2, Benzylradikal(34) und Ketylradikalanion(35)(Schema 7).

Schema 7



Die obigen Reaktionsprodukte deuten an, dass bei der Modellreaktion Schritt a der Vorzug gegeben werden muss.

III. Eigene Arbeiten

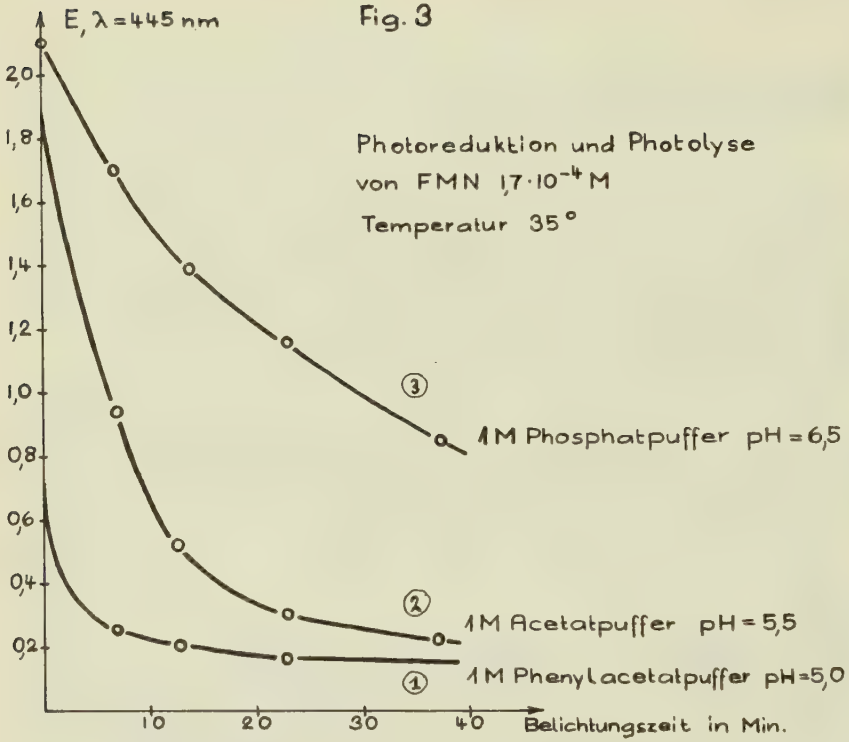
In einer persönlichen Mitteilung berichteten uns 1965 G. Weber (Illinois) und V. Massey (Michigan), dass Flavin in Phenylacetat-Puffer durch Licht irreversibel photoreduziert wird. Dies veranlasste uns entsprechende Versuche auf Flavin-Modelle anzuwenden [5o].

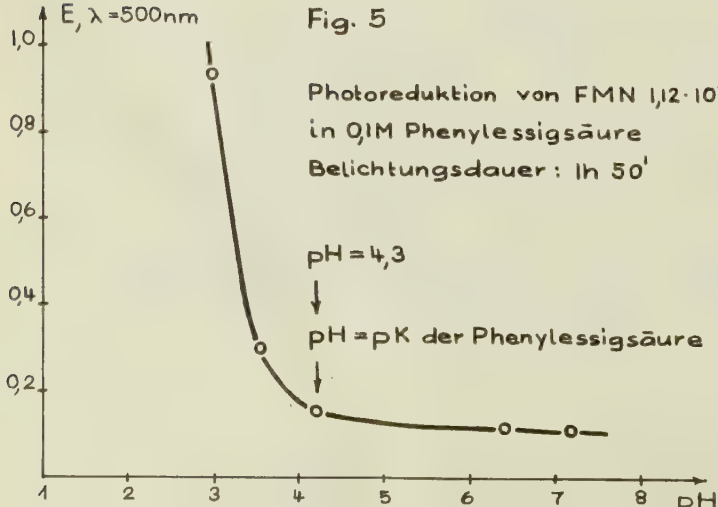
A. Spektrophotometrische Untersuchung der Photoreduktion von Azachinonen durch Arylessigsäuren.

1. FMN

FMN ist im Dunkeln bei Zimmertemperatur in Acetat- Phosphat- und Phenylacetat- Puffer unbegrenzt haltbar. Werden dagegen in 1 cm Quarz-Küvetten anaerobe Lösungen von FMN in Phosphatpuffer, Acetatpuffer und Phenylacetatpuffer im Abstand von 15 cm mit einer 4o Watt W-Lampe bei 35^{o} belichtet, so tritt Photoreduktion des Flavins ein.

In Figur 3 ist die Extinktion von FMN, gemessen bei λ= 445 nm gegen die Belichtungszeit aufgetragen. Kurve 2 und 3 zeigt eine reine Flavin-Photolyse (vergl. Abschnitt IB,4a), während die merkliche Beschleunigung der Flavochinonabnahme in Kurve 1 gegenüber 2 und 3 eine Photoreduktion von FMN durch Phenylessigsäure oder Phenylacetat beweist (vergl. dazu die Quantenausbeuten der Flavin-Photolyse und Photoreduktion in Abschnitt IB,4b).


E, λ=445 nm
Fig. 3
Photoreduktion und Photolyse
von FMN 1,7·10⁻⁴ M
Temperatur 35°
③
1 M Phosphatpuffer pH = 6,5
②
1 M Acetatpuffer pH = 5,5
①
1 M Phenylacetatpuffer pH=5,0
2,0
1,8
1,6
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
10
20
30
40
Belichtungszeit in Min.


E, λ=500nm
Fig. 5
Photoreduktion von FMN 1,12·10⁻³ M
in 0,1M Phenylessigsäure
Belichtungsdauer: 1h 50'
pH=4,3
pH=pK der Phenylessigsäure
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
1
2
3
4
5
6
7
8
pH

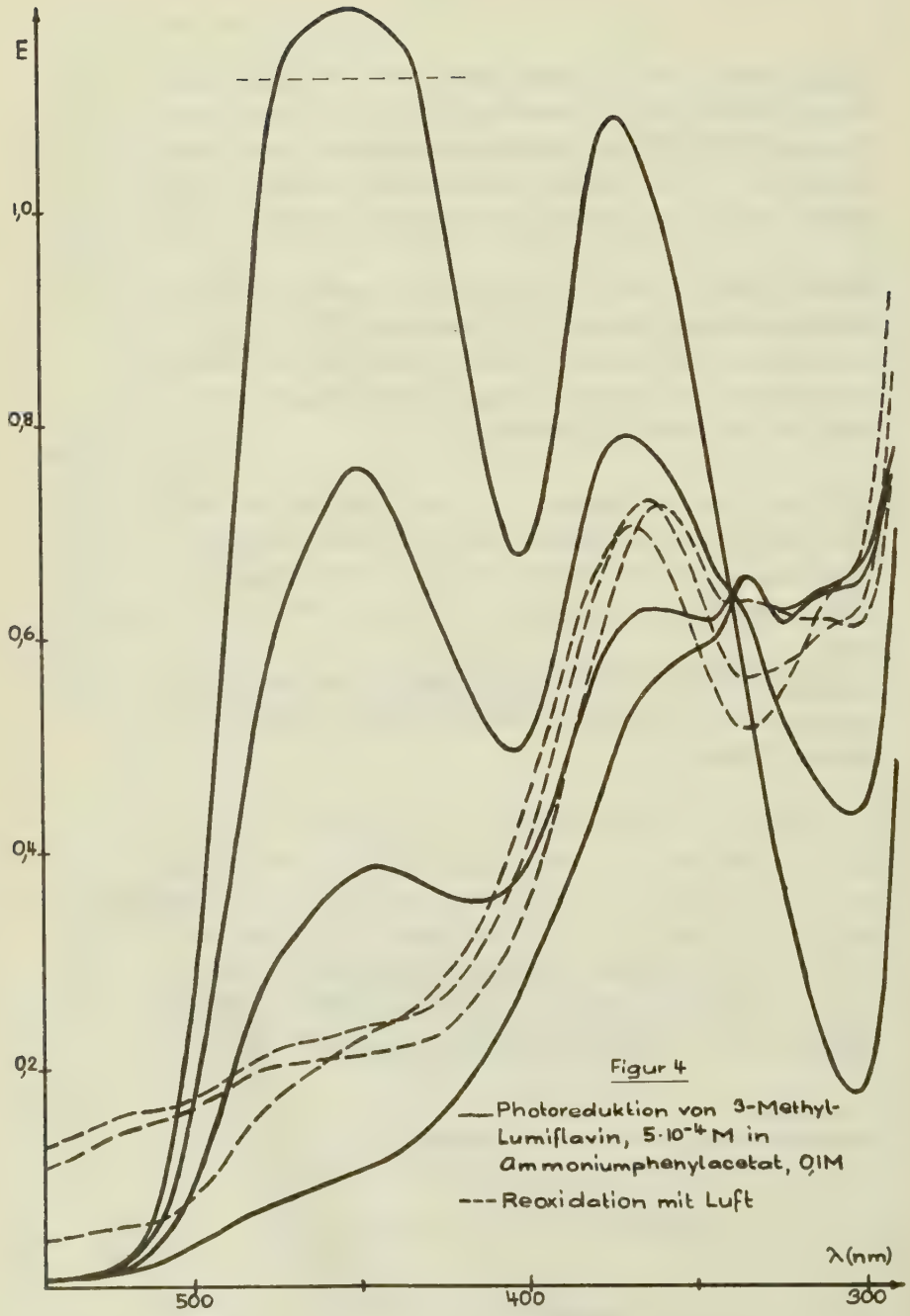
Figur 4 zeigt den typischen Verlauf der Photoreduktion eines Flavochinons in Phenylacetat-Puffer, wobei das Spektrum der vollständigen Photoreduktion nahezu identisch ist, mit dem eines durch anaerobe Reduktion von FMN mit Pd/H_2 oder $Na_2S_2O_4$ erhältlichen Spektrums.

Während der Photoreduktion werden pro reduziertes Flavin stöchiometrische Mengen CO_2 freigesetzt.**
Das Wirkungsspektrum der Photoreduktion fällt annähernd zusammen mit der längstwelligen (π-π^*)- Absorptionsbande des Flavochinons.**

In Figur 5 ist die Abnahme der FMN-Konzentration bei der Photoreduktion gegen den pH der Phenylessigsäure aufgetragen. Daraus geht hervor, dass eindeutig das Phenylacetat-Jon die reaktive Spezies der Photoreduktion ist.
Figur 6 schliesslich zeigt die Abhängigkeit der Photoreduktion von FMN von der Konzentration des Phenylacetat-Puffers.

Aufschluss über die Reversibilität der Photoreduktion gibt die nachträgliche Reoxidation mit Luft-Sauerstoff. So oxidiert z.B. 10^{-3}M $FMNH_2$ mit O_2 zu FMN, wobei spektrometrisch (UV,ESR) praktisch kein Radikal intermediär nachweisbar ist (vergl. Abschnitt IB). Ebenso reoxidieren anaerob mit EDTA photoreduzerte $FMNH_2$- Lösungen spontan mit Luftsauerstoff (Abschnitt IIIA,2) [34].

** Persönliche Mitteilung V. Massey

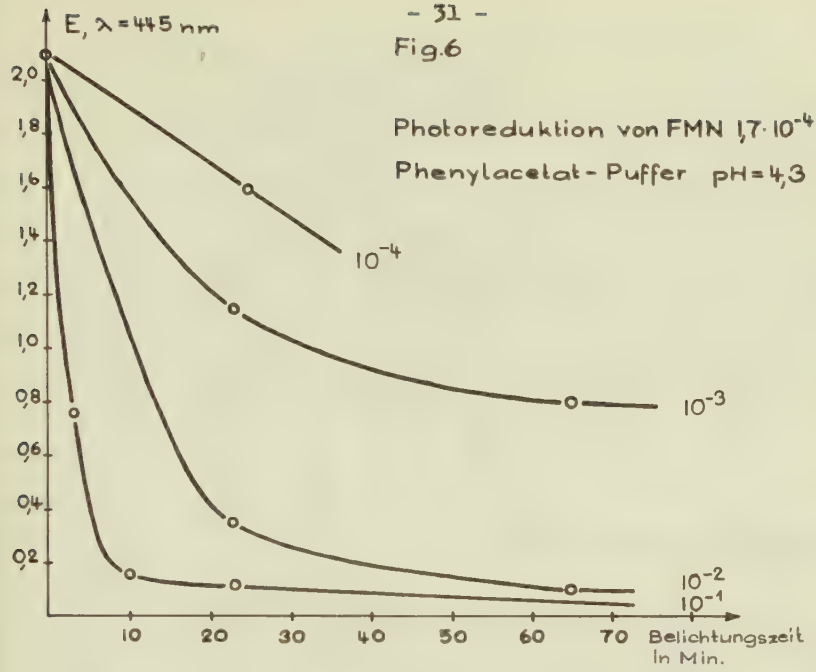


Figur 4

—— Photoreduktion von 3-Methyl-Lumiflavin, $5 \cdot 10^{-4}$ M in Ammoniumphenylacetat, 0,1M

--- Reoxidation mit Luft

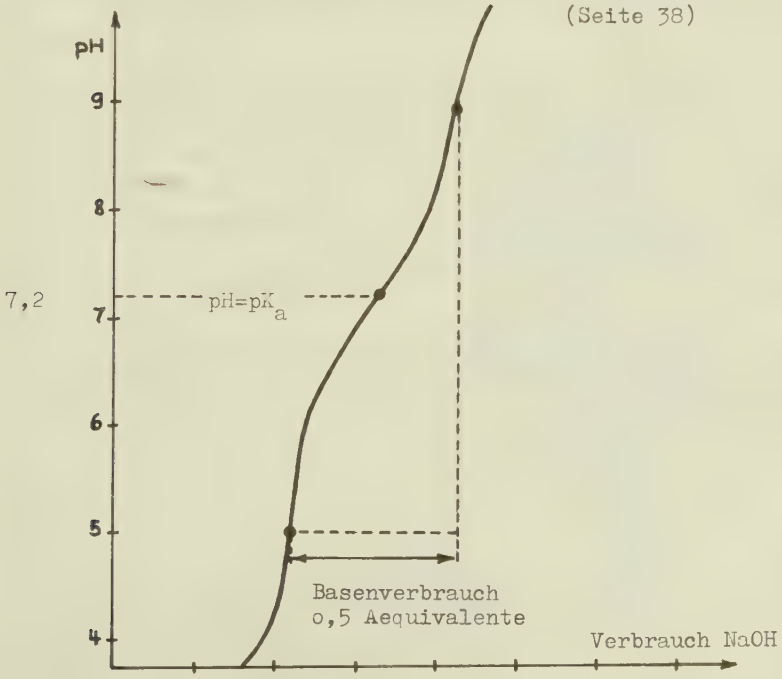
Fig.6



Figur 7

Titration des Photoreduktionsgemisches IIa und IIIa

(Seite 38)



Demgegenüber zeigt eine mit Phenylacetat anaerob photoreduzierte FMN-Lösung mit Sauerstoff keine spontane Oxidierbarkeit zum Flavochinon, wohl aber eine intermediär auftretende Grünfärbung (λ_{max}= 57o und 62o nm, pH 5) welche erst nach einiger Zeit unter Zunahme der Chinonabsorption verschwindet. Jedoch wird das Startspektrum bei weiterer Lufteinleitung nie erreicht. Im Abschnitt IIIC wird gezeigt werden, dass es sich bei der Grünfärbung um ein neutrales Semichinon handelt.

2. Arylessigsäuren und Analoge

Tabelle 2 zeigt die anaerobe Photoreduktion von Lumiflavin-3-essigsäure (Schema 8, Ib) durch Arylessigsäuren, wobei wir uns durch die Variation der Substituenten R_1 und R_2 bei Arylacetaten erste Aufschlüss über die Spezifität dieser photoinduzierten Reduktionsmittel erhofften.
Zum Vergleich sind in Tabelle 3 andere Substrate aufgeführt, von denen wir auch Photoreaktivität gegenüber Flavochinon feststellten. Von den in Tabelle 2 und 3 aufgeführten Substanzen ist bisher einzig die Photoreaktion von EDTA (Tabelle 3, Nr 18) und Triäthylamin (Nr. 21) mit FMN und Riboflavin beschrieben worden [33][34].

Aufgrund der in Tabelle 2 aufgeführten Resultate ist demnach zwischen 4 Klassen von Arylessigsäuren zu unterscheiden.

Tabelle 2

Anaerobe Photoreduktion von Lumiflavin-3-essigsäure, 10^{-4}M in Arylacetat 10^{-1}M.

Nr	R_1	R_2	R_2-C_6H_4- CHR_1-COO^-	pH	Geschwindigkeit der Photoreduktion ++ schnell + langsam - keine	Reversibilität der Photoreduktion (reduzierte Lösung belichtet und mit Luft oxidiert) + schnell - langsam ++ 100% Chinonrückbildung	Radikalbildung bei Reoxidation mit Luft + ja - nein
1	H	H	Phenylessigsäure	6,5	+	-	+
2	CH_3	H	αPhenylpropionsäure	7	+	-	-
3	NH_2	H	dl-Phenylglyzin	12	++	++	-
4	OCH_3	H	αMethoxyphenylessigsäure	5	++	++	-
5	H	CH_3	oTolylphenylessigsäure	6,5	++	-	+
6	H	CH_3	mTolylphenylessigsäure	6	+	-	+
7	H	CH_3	p-	6,5	+	-	+
8	H	OCH_3	oMethoxyphenylessigsäure	6,5	+	-	+
9	H	OCH_3	m-	6	+	-	+
10	H	OCH_3	p-	6,5	+	-	+
11	OH	H	dl-Mandelsäure	6	++	++	-
12	H	OH	p-Hydroxyphenylessigsäure	7,5	-		
13	H	NO_2	p-Nitrophenylessigsäure	7	-		
14	H	NO_2	m-	7	-		
15	H	NO_2	o-	7	-		
16	Et	H	α-Phenylbuttersäure	11	++	-	-
17	H	NH_2	p-Aminophenylessigsäure	9,5	-		

Tabelle 3

Fortsetzung von Tabelle 2

Photoreduktion von Lumiflavin-3-essigsäure 10^{-4}M mit Substraten

18	EDTA 10^{-1}M in H_2O, pH 7	++	++	-
19	$NaBH_4$ 10^{-1}M in MeOH abs	+	-	-
20	N-Methylmorpholinpuffer 10^{-1}M, pH 9,5	+	++	-
21	Tiäthylamin 0,1M in H_2O	+	++ ?	-
22	Vinylessigsäure 10^{-1}M, pH 7	+	-	+
23	Phenylalanin 10^{-1}M pH 11	++	++	-

1. Klasse, Nr. 3,4,11. Reduziert schnell, bildet nach Lufteinleiten unter Uebersprungung der Radikalstufe spontan und quantitativ das Ausgangsflavin zurück. - Alle diese Säuren haben in α-Stellung zur Carboxylgruppe einen elektronenabgebenden +M-Substituenten. (Vergl. dazu auch in Tabelle 3 Nr. 23).

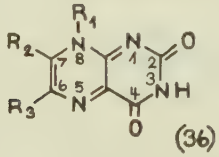
2.Klasse; Reduziert langsam, reduzierte Lösung zeigt mit Luft nur langsam unvollständige Reoxidation unter Radikalbildung. - Neben Phenylessigsäure (Nr. 1) noch Tolyl- und Methoxyphenyl- Essigsäuren (Nr. 5- 1o) in Tabelle 2. (Vinylessigsäure in Tabelle 3).

3. Klasse; Reduziert langsam, zeigt mit Luft langsame Reoxidation ohne Radikalbildung. - Besitzen Alkylgruppen in α-Stellung zur Carboxylgruppe: Nr. 2,14.

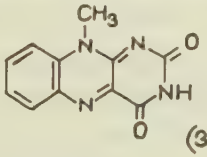
4. Klasse; Zeigt keine merkliche Photoreaktivität: Nr. 12-15 und 17.

3. Phenylacetat und Azachinone

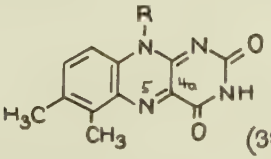
Photolabilität mit Phenylacetat wurde bei verschiedenen Alkyl-pteridin-dionen(36) und deren 6,7-benzanellierten Derivaten, d.h. Flavocoenzymen, Riboflavin(1), Lumiflavin(2)(Schema 1), Lumichromen[Schema 5, (3) und (15)], Methylisoalloxazinen(37), sowie Isoflavinen(38) gefunden.



(36)



(37)



(38)

Bei Reoxidation mit Luft kein Radikal nachweisbar.

B. Präparative Methoden

1. Photoalkylierungsprodukte aus Lumiflavin und Arylessigsäuren.

a) Ausführung und Aufarbeitung

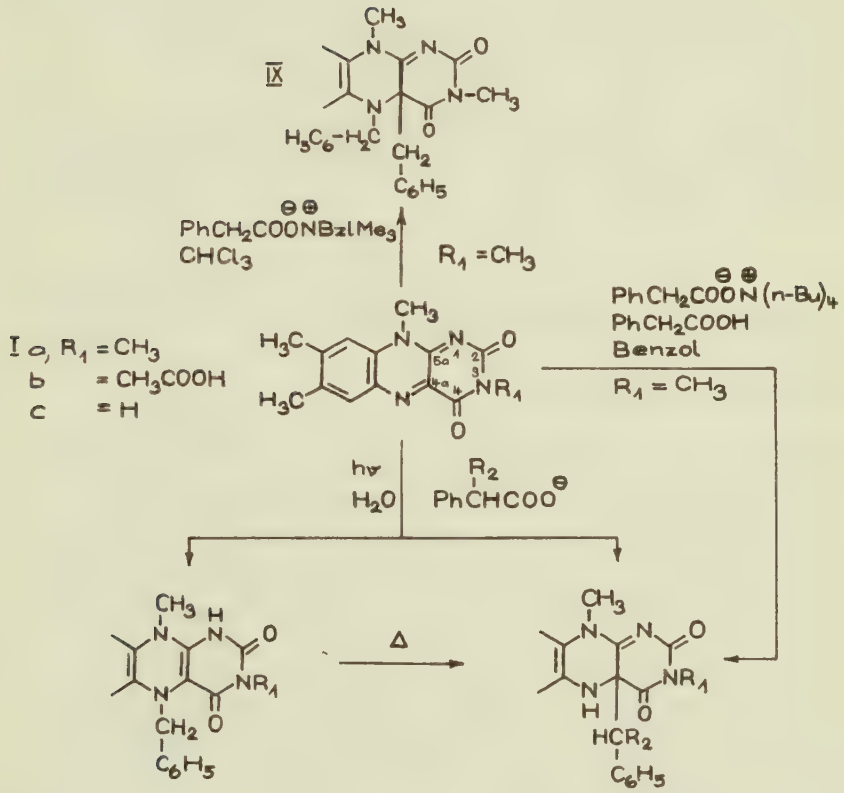
Die in Kapitel IIIA,2 spektroskopisch gefundenen Daten veranlassten uns, die Isolierung der irreversiblen Photoreduktionsprodukte aus Arylacetaten vom Typ 2 und 3 mit Modellflavinen zu versuchen.
An eine Photoapparatur (vergl. Abschnitt V, Schemazeichnung S.58) stellen sich somit folgende Forderungen :

1. Gleichmässige, intensive Belichtung
2. Thermostatisierung
3. Absolute Luftfreiheit und Ableitung von CO_2 durch eingeleiteten N_2-Strom
4. Durchmischung der Reaktionsschicht.

Ausgehend von einer Aufschlämmung von 3-Methyl-lumiflavin Ia (Schema 8) in Wasser konnte bei einem Ueberschuss von Phenylacetat nach 15 Stunden Belichtung bei Zimmertemperatur spektrophotometrisch bei λ= 450 nm kein Startmaterial mehr nachgewiesen werden. Bei Luftzutritt verfärbte sich die Mischung spontan Grün. Dies wurde durch Zusatz von Dithionit verhindert.

Filtration und Trocknung ergab ein gelbgrünes Pulver, wobei die Ausbeuten schon auf eine kovalente Bindung von Flavin und Benzylrest hindeuteten. Dünnschichtchromatographie zeigte eine Mischung zweier Substanzen.

Schema 8


IX
PhCH2COONBzlMe3
CHCl3
R1 = CH3
PhCH2COON(n-Bu)4
PhCH2COOH
Benzol
R1 = CH3
I a, R1 = CH3
b = CH3COOH
c = H
hν
H2O
R2
PhCHCOO
Δ
II a, R1 = CH3
b = H
NH3 löslich
pKa(NH) = 7,2
III a, R1 = CH3, R2 = H
b = H, = H
c = CH3, = CH3
d = CH2COOH, = H
NH3 unlöslich

Die unterschiedliche Löslichkeit in verdünntem Ammoniak machte die Trennung des Gemisches möglich, nämlich in 3-Methyl-5-benzyl-lumiflavohydrochinon (IIa) und 3-Methyl-4a-benzyl-4a,5-dihydro-lumiflavin (IIIa). Schema 8. (Seite 37)

Die Titration des Gemisches zeigt nur für die Hälfte der eingewogenem Substanz ein titrierbares pK. Figur 7. (Seite 31)

b) Charakterisierung der Alkylierungsprodukte

NH_3- lösliches Produkt (IIa)

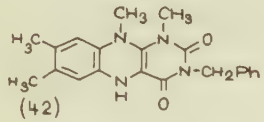
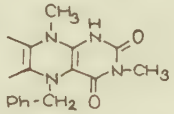
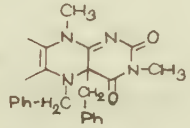
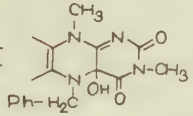
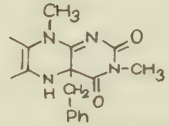
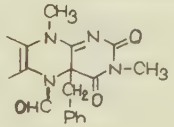
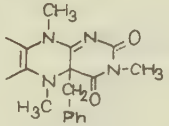
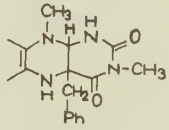
Elementaranalyse: $C_{21}H_{22}O_2N_4$

1. Diese in schwachen Basen lösliche Verbindung wird mit verdünnter Essigsäure wieder ausgefällt. Mit einem pKa von 7,2 hat sie damit die typische Azidität eines 1,5-Flavohydrochinons (vergl. Fig. 7), Seite 31.

2. Im NMR-Spektrum sind alle CH-Gruppen des Flavochinons Ia erkennbar, zuzüglich zweier Methylenprotonen und 5 nicht aufgelöster Phenylprotonen. Die vermutete 1-NH- Gruppe konnte nicht beobachtet werden, da die Messungen zur ~~unter~~ Vermeidung paramagnetischer Beimischungen in $CDCl_3$, gesättigt mit Dithionit-haltigem D_2O ausgeführt werden mussten. Vergleich der Methylenprotonen verschiedener Benzyl-Flavin-Typen beweist bei IIa die Anwesenheit einer N-Benzyl-Gruppierung. Tabelle 4.
   Im analogen Phenyl-(deutero-methylen)-acetat- Photoprodukt vermindert sich das Methy lensignal um 90%.

Tabelle 4

Chemische Verschiebung der Methylenprotonen von Benzyl-Flavohydrochinonen, bzw. -Dihydroflavinen (in ppm)

	$CDCl_3$		CF_3COOH
	$N\text{-}CH_2$-	$C\text{-}CH_2$-	
 (42)	5, 2		
IIa 	5, 2 ($CDCl_3/D_2O/Na_2S_2O_4$)		
IX 	4,35	3,0 AB	
V 	4,67		
IIIa 		3,0 AB	3,4
VIII 		3,1 AB	3,5
X 		3,0 AB	3,35
VII 		3,1 AB	

3. Im IR zeigt die Substanz zwei starke CO- Banden (CH_2Cl_2) und eine breite NH- Streckschwingung im 3 μ- Bereich.

4. In Uebereinstimmung mit der hypsochromen Verschiebung des Elektronenspektrums beim Uebergang vom Flavochinon zum Flavohydrochinon zeigt die Substanz bei pH 5 ein λ_{max} von 342 nm [19].

Diese Ergebnisse verlangen für das NH_3- lösliche Photoprodukt die Struktur eines 3-Methyl-5N-benzyl-flavohydrochinons IIa. Schema 8

Charakterisierung des NH_3-unlöslichen Photoproduktes(IIIa)

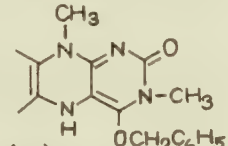
Elementaranalyse: $C_{21}H_{22}O_2N_4$

1. Die Substanz zeigt kein titrierbares pK.

2. Das NMR hat alle CH- Gruppen des Isomeren IIa. Eine NH- Gruppe ist erkennbar und tauscht gegen D_2O aus. Dagegen hat sich das Methylensignal nach so hohem Feld verschoben ($\delta = 3{,}o$), dass nur auf ein C- Benzyl geschlossen werden kann. Dieses Signal spaltet sehr schwach in ein AB- Signal (Differenz 3-4 Hz) auf, wobei nur die zwei inneren Hauptbanden erkennbar sind. Diese Aufspaltung der Methylengruppe (J= 12 - 15 Hz) verlangt deren Fixierung an einem asymmetrischen Zentrum [51][52]. - Auch hier zeigt das Deutero- Photoprodukt Verminderung des Signals um 9o%.

3. Im IR zeigt die Verbindung beide CO- Streckschwingungen, die 4-CO jedoch mit geringerer Intensität. Bei 3350 cm^{-1} erscheint eine scharfe NH- Bande vom Pyrrol- Typ, welche von K.H. Dudley bereits bei 1-Alkyl-5-NH-flavohydrochinonen beobachtet wurde [45].

4. Durch Hydrierung konnte bewiesen werden, dass es sich nicht um ein O-Benzyl- Isomeres, z.B. (39), handeln kann.



(39)

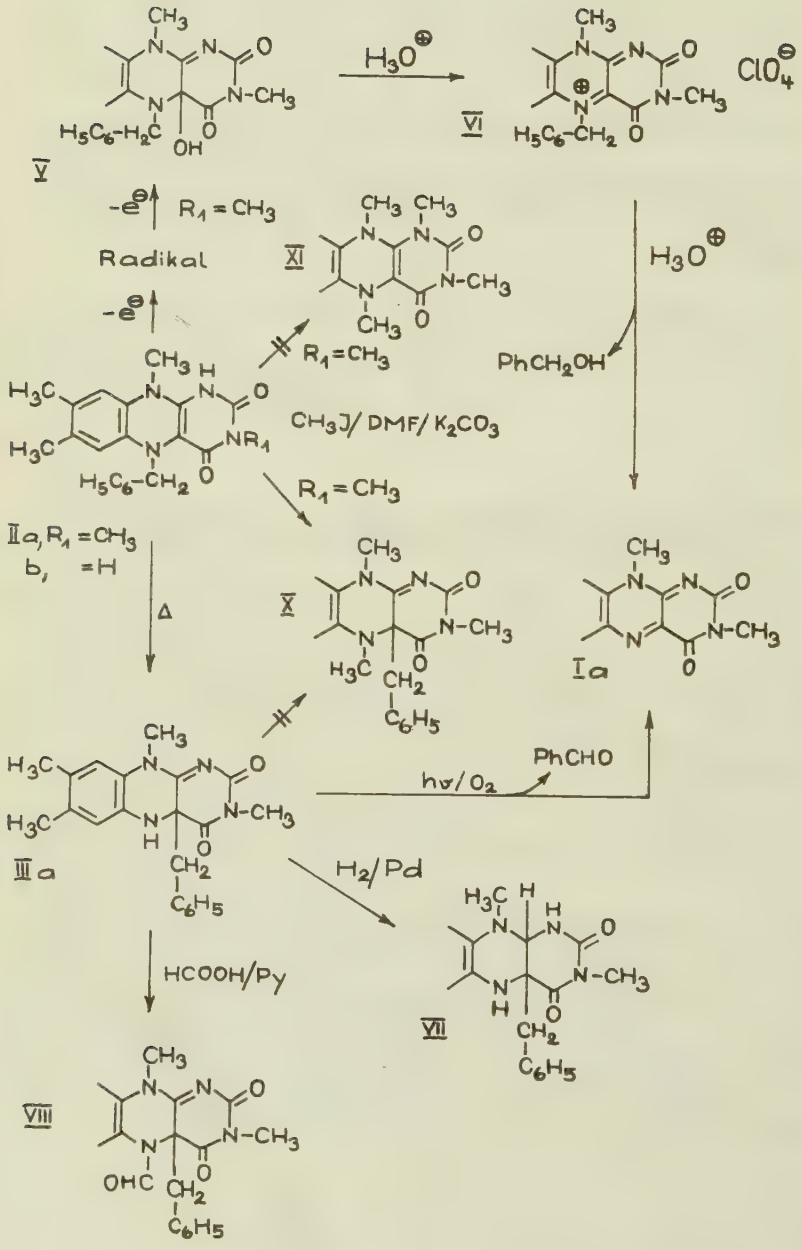
O-Benzyl- Gruppen werden bekanntlich leicht hydrogenolytisch gespalten [52]. ~~Vielmehr~~ Jedoch nimmt die Verbindung (39) mit Pd in Eisessig langsam genau ein Mol Wasserstoff auf unter Bildung eines stabilen Tetrahydroflavins $C_{21}H_{22}O_2N_4$ (VII)(Schema 9), wobei sich das Elektronenspektrum weiter hypsochrom verschiebt, bis zu λ_{max}= 312 nm (MeOH), der Absorption des o-Phenylendiamins.

5. Mit Ameisensäure in abs. Pyridin wird ein Formylprodukt $C_{22}H_{22}O_3N_4$ (VIII) erhalten.

Daher ist die Struktur eines Dihydroflavins IIIa (Schema 8) für die NH_3- unlösliche Substanz zwingend.

Zwar wird die Substanz III a erst ab pH 1 reversibel protoniert. Dies ist umso erstaunlicher, als die Struktur den pKa eines Anilins (um 4,5) erwarten lässt. Offenbar handelt es sich hier um den ähnlichen Effekt,

Schema 9


H3O⊕
ClO4⊖
V
VI
-e⊖
R1 = CH3
Radikal
XI
H3O⊕
PhCH2OH
R1 = CH3
CH3J/ DMF/ K2CO3
R1 = CH3
IIa, R1 = CH3
b, = H
Δ
X
Ia
PhCHO
hν/ O2
IIIa
H2/Pd
HCOOH/Py
VII
VIII

wie beim 2,4,6-Tri-t-butylanilin, für das ein pKa 2 festgestellt wurde [53]: die Alkylgruppen ~~blockieren~~ behindern die Protonierung des freien Elektronenpaares.

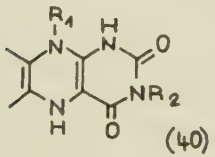
Photoreaktion bei 5o° C

Wird dieselbe Photoreaktion bei 5o° C ausgeführt, so bildet sich ausschliesslich quantitativ das NH_3- unlösliche Photoprodukt IIIa.
Ebenso lagert Flavohydrochinon IIa thermisch in das Dihydroflavin IIIa um (vergl. dazu Abschnitt IIIC).* Schema 8.

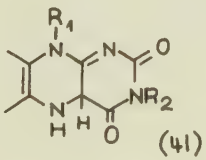
Auch führt die Photoreduktion beim Ersatz des Phenylacetats durch α-Phenylpropionat, einem Vertreter des Typs 3 (Abschnitt IIIA,2) bei Zimmertemperatur zur quantitativen Bildung eines 4a-α-Phenäthyl-dihydroflavins $C_{22}H_{24}O_2N_4$ IIIc. Schema 8.
Diese Substanz unterscheidet sich vom analogen 4a-Benzyl-dihydroflavin IIIa nur im NMR: An Stelle der Methylengruppe von IIIa erscheint in IIIc bei $\delta = 3{,}35$ ein Proton als Quartett ($J = 7$ Hz) und bei $\delta = 1{,}35$ ein Methyl-Dublett mit derselben Kopplungskonstante.

---

* Zur Nomenklatur: Als Flavohydrochinon (früher Leukoflavin) bezeichnen wir die 1,5-Dihydro-struktur(4o), die 4a,5- isomere Verbindung(41) dagegen als allgemein Dihydroflavin.



(40)



(41)

c) Alkylierung der Photoprodukte

Unter den Photoreduktionsprodukten konnten auch unter veränderten Reaktionsbedingungen nie O-Alkylprodukte [z.B. (39)] aufgefunden werden.
Dies veranlasste uns die weitere Alkylierung von IIa und IIIa zu untersuchen, wobei wir jedoch nur beim Flavo-Hydrochinon IIa eine Umsetzung fanden. Schema 9. Dabei bilden sich erstaunlicherweise weder 2- oder 4-O-Alkyl-produkte (vergl. Abschnitt IIA), noch die 1-N-Alkyl-verbindung XI, sondern ausschliesslich das 4a-Benzyl-5-methyl-dihydroflavin X (Schema 9).
Also muss während der Synthese eine Umlagerung der Verbindung IIa nach IIIa erfolgt sein, möglicherweise über eine Quarternisierung am N5 des Hydrochinons IIa.

Dies steht in Uebereinstimmung mit der thermisch beschleunigten Umlagerung des Flavohydrochinons IIa in das Dihydroflavin IIIa: Substanz IIa 5 Minuten auf 100° erwärmt, lagert sich vollständig in IIIa um. In Pyridin tritt diese Isomerisierung schon bei 60° ein.

Dagegen schlugen alle Versuche fehl, Dihydroflavin IIIa zu alkylieren. Weder konnten O-Alkyl- Produkte noch 4a,5-Dihydroflavin X auch unter drastischen Bedingungen (Hünig-Base,* CH_3J, DMF bei 45°) nachgewiesen werden.

---

* Reiner Protonenakzeptor, vergl. [58], = N-Aethyl-diisopropylamin.

2. Photoprodukte in aprotischem Milieu

Photoreduktion des Flavochinons bei Zimmertemperatur in aprotischem Milieu, z.B. Benzol oder Chloroform und entsprechend löslichen Ammoniumphenylacetaten mit Protonen (in Form von Phenylessigsäure) liefert ausschliesslich Dihydroflavin IIIa; d.h. primär erfolgt die Photo-Benzylierung immer in der 4a-Brückenposition. Schema 8.

Dagegen liefert unter Ausschluss von Protonen eine Photoreduktion von 3-Methyllumiflavin Ia in $CHCl_3$ mit Benzyl-trimethylammonium-Phenylacetat bei 15 stündigem Belichten nur noch ein schwerisolierbares 3-Methyl-4a,5-dibenzyl-dihydroflavin IX in mässiger Ausbeute.

Dabei erhebt sich die Frage, ob der 2. Benzylrest am N-5 aus dem Phenylacetat oder dem Benzylammonium-Jon stammt. Dazu sind weitere Untersuchungen nötig.

C. Oxidation der Photoflavine

1. 4a-Benzyl-4a,5-dihydrolumiflavine III

Dihydroflavin IIIa ist unter aeroben Bedingungen lichtempfindlich. So tritt in aeroben Lösungen durch Belichten mit Tageslicht nach Minuten schon Photooxidation unter quantitativer Chinonbildung (Ia) ein. Schema 9. Dabei ist kein Radikal intermediär nachweisbar. Wird diese Photooxidation mit Jod ausgeführt, so zeigt sich ein Jodverbrauch von 2 Aequivalenten.

Dies steht in Uebereinstimmung mit dem gaschromatographisch bestimmten Oxidationsprodukt der aeroben Photooxidation von IIIa: Bei quantitativer Chinonbildung(Ia) entsteht aus dem Benzylrest Benzaldehyd in 90% iger Ausbeute (vergl. Abschnitt V).

Demgegenüber sind die Dihydroflavinkörper IX (Schema 8), VIII und X sowie das Tetrahydroflavin VII (Schema 9) nicht mehr photolabil. Unter oxidativen Bedingungen (H_2O_2, HONO) lassen sie sich jedoch zum Chinon Ia rückführen.

2. 5-Benzyl-flavohydrochinone II

Lösungen des Flavohydrochinons IIa sind nicht photolabil, reagieren aber spontan mit Oxidationsmitteln. Schon Luftzutritt genügt, einer schwachgelben Lösung von IIa in Minuten eine intensiv dunkelgrün-blaue Färbung zu geben. ESR- Messungen zeigen, dass es sich hierbei um ein Radikal handelt * (Abschnitt IIIC,3). Bei weiterer Luftoxidation verschwindet die Grünfärbung unter Bildung einer Verbindung V, $C_{21}H_{22}O_3N_4$, welche gegen weitere Luftoxidation stabil ist. Schema 9. Mit Jod als Oxidationsmittel werden genau 2 Elektronenäquivalente verbraucht.

Diese neue Verbindung (V), am besten isolierbar durch Oxidation mit Ferricyanid, zeigt im IR zwei Carbonyl-Banden, aber nicht mehr das ν_{assoz} des Hydrochinons IIa. Das NMR-Spektrum besitzt alle Protonen des Startmaterials IIa, jedoch haben die zwei C-CH_3- Gruppen eine merklich verschiedene chemische Verschiebung, was auf eine höhere Asymmetrie der π-Elektronenverteilung

---

* Die Messungen wurden bei A. Ehrenberg am Nobelinstitut in Stockholm ausgeführt.

schliessen lässt. Die Methylenprotonen der Benzylgruppe erscheinen bei noch tieferem Feld. Zusätzlich taucht bei 1,65 ppm ein breites, in D_2O austauschbares Proton auf.

Daraus ordnen wir dieser Verbindung V die Struktur einer Pseudobase eines 5-Alkyl-flaviniumsalzes VI zu. In Uebereinstimmung damit wird Verbindung V bei pH 2 in das dunkelrote Flavinium-Salz VI übergeführt, welches sich als wenig beständiges Perchlorat isolieren lässt.

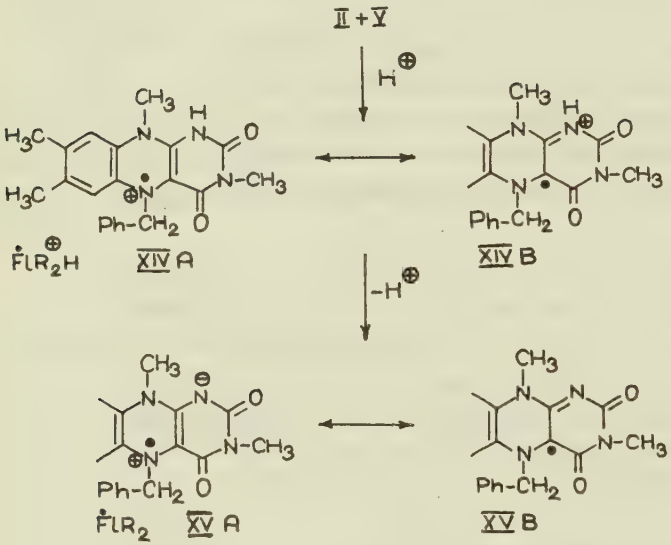
Wird dagegen Flaviniumsalz VI anaerob in 6M Mineralsäure kurzzeitig auf 80° erwärmt, so verschwindet die Färbung spontan unter quantitativer Chinonbildung Ia. Neutralisation und Extraktion der Lösung in Aether zeigt gaschromatographisch die quantitative Verseifung des Benzylrestes zu Benzylalkohol (Schema 9).

3. 5-alkylierte Semichinone

Werden stöchiometrische Mengen der Pseudobase V und des Hydrochinons IIa anaerob gelöst und mit einem Ueberschuss an Mineralsäure versetzt, so entsteht unter Komproportionierung das rote Radikalkation XIVA und -B, aus dem durch Neutralisation das grüne Neutral-Radikal XVA und -B erhältlich ist. Schema 10.

XVA und XVB sind mesomere Grenzstrukturen, wobei A die ~~vermutete~~ hohe Spindichte auf N-5 berücksichtigt, B dagegen die Chloroformlöslickeit besser erklärt.

Schema 1o: Radikalstrukturen



Mit diesem 3-Methyl-5-benzyl-flavosemichinon XV als Modellflavin konnten folgende Zuordnungen getroffen werden:

1. Das freie, blaugrüne Flavosemichinon $\dot{F}lH_2$, welches zuerst von H. Beinert in Lösung spektral charakterisiert wurde [55] ist ein 5-Monohydro-flavin (5-$\dot{F}lH_2$), XVI (Schema 1o).

2. Bei dem von Hemmerich et al beschriebenen Semichinon, erhältlich durch zweiphasige Reduktion von Flavochinon Ia

mit Dithionit und Alkylieung mit Aethyljodid [19] handelt es sich nicht wie vermutet um ein 4-O-Alkylsemichinon, sondern um das isomere 5-Alkyl-Radikal [Schema 1o, XV (5-benzyl = Et)].

3. Die in Kapitel IB,3 erwähnten blauen Flavoprotein-Semichinone - Typ A, Neutrale Radikale, "Blaue Radikale", λ_{max} = 57o und 62o nm [55] - sind in erster Näherung spektral identisch mit obigem Modellradikal.

   In Figur 8 werden Modell und Enzym verglichen. Somit konnte diese Vermutung von Palmer und Massey [24][55] bestätigt werden (vergl. dazu Seite 13).

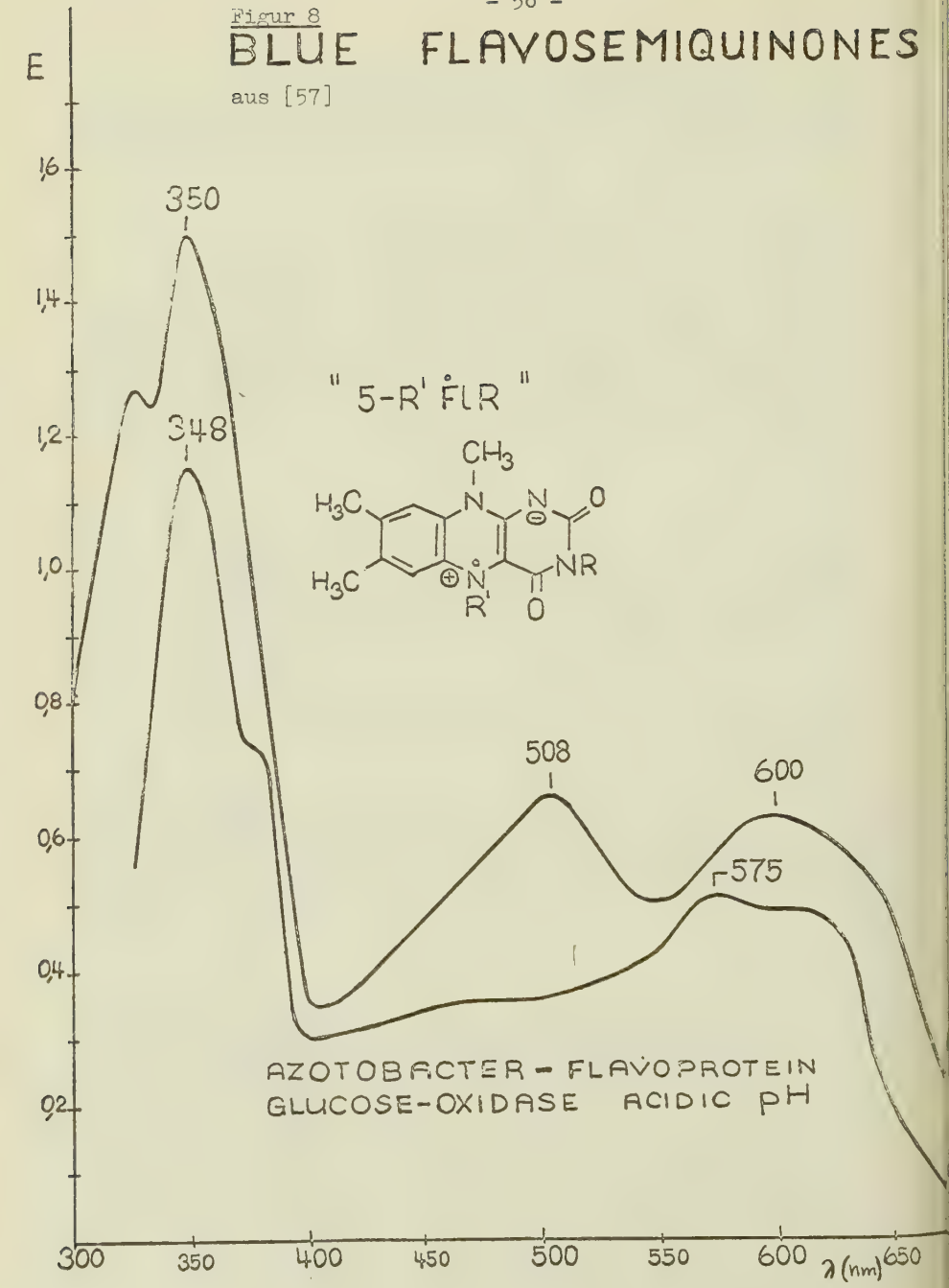
Die Oxidation vom Flavohydrochinon IIa zur Pseudobase V (Schema 9) ist reversibel. Die Reduktion kann wässrig mit Dithionit erfolgen, wobei intermediär das grüne Radikal wieder erscheint.

Die Reduktion mit RSH jedoch bleibt bei der Radikalstufe stehen. Das Radikal ist offensichtlich nicht imstande, mit RSH zu reagieren.
Wir sehen hierin ein Modell für die Liponamid-Dehydrogenase (Tabelle 1, Nr. 6) und interpretieren dies nach Schema 11 [57][58].

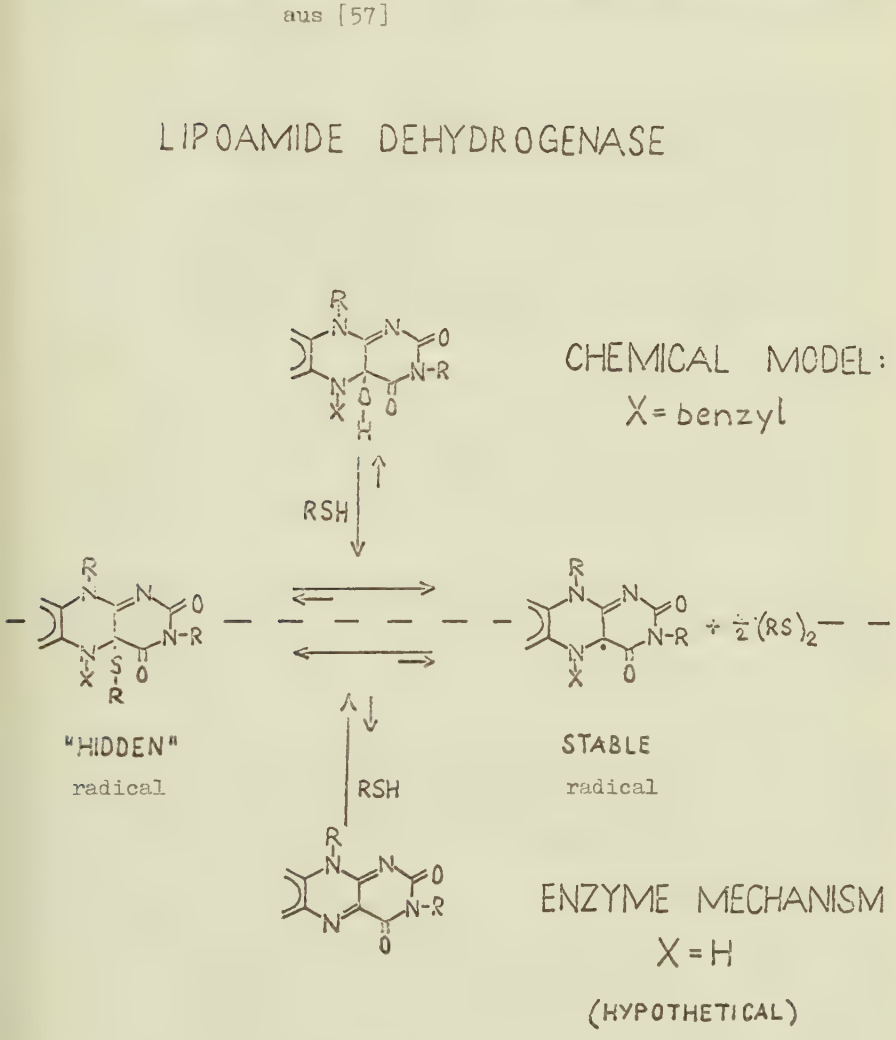
Figur 8

BLUE FLAVOSEMIQUINONES

aus [57]



Schema 11: Erklärung "verborgener" Flavosemichinone, aus [57]



IV. Theoretische Ergänzungen

A. Zur irreversiblen Photoreduktion

Die in Abschnitt III und IV beschriebenen Photoreduktionen von Flavochinon mit Phenylacetat bei 50° C und nachfolgender Photooxidation des Benzyl-dihydroflavins verläuft nach folgenden stöchiometrischen Gleichungen:

$$PhCH_2COO^- + H_2O + FlH_{Ox} = FlH_2Bzl_{Red} + CO_2 + OH^-$$

$$FlH_2Bzl_{Red} + 3/2\ O_2 = FlH_{Ox} + PhCHO + H_2O_2$$

$$PhCH_2COO^- + H_2O + 3/2O_2 = PhCHO + CO_2 + H_2O_2 + OH^-$$

Die Flavinwirkung bleibt hierbei katalytisch. Somit handelt es sich um eine flavin-sensibilisierte Photooxidation des Phenylacetats.

Ueber den Mechanismus dieser Photoalkylierung wissen wir noch sehr wenig. Hier bedarf es noch weiterer Studien, wie Bestimmung von Quantenausbeuten und Reaktionsordnungen, sowie Untersuchung der Photoreduktion bei Zusatz von Löschern.

Aus Analogie zu beschriebenen Photoreduktionen und Photolysen kann als photochemischer Primärakt die Beteiligung eines Flavin-Tripletts angenommen werden (vergl. Abschnitt IB,4). Als Sekundärreaktion für Phenylacetate der Klasse 2 und 3 (Abschnitt IIIA,2) vermuten wir den in Abschnitt IIB vorgeschlagenen 1-Elektronentransfer vom Phenylacetat auf das Flavin unter Bildung von CO_2, Benzylradikal und Flavosemichinon.

Prinzipiell bestehen jedoch nach der Decarboxylierung des Phenylacetats je nach Anzahl der transferierten Elektronen die Reaktionsmöglichen

a) $\text{Benzyl}^{-} + \overset{\cdot}{\text{F}}\text{lH}_{\text{Ox}}$,

b) $\text{Benzyl}^{\cdot} + \text{FlH}_{2\ \text{Rad}}$,

welche dann zu 4a-Benzyl-dihydroflavinen, bzw 5-Benzyl-flavohydrochinonen führen.

Temperaturabhängigkeit der Produktebildung und ausschliessliche Substitution bei α-Alkyl- Phenylacetaten in der 4a-Brückenposition lassen jedoch auch sterische Effekte vermuten.

Das Verhalten von Arylacetaten der Klasse 1 (Schnelle Photoreduktion, spontane Reversibilität) könnte analog interpretiert werden, wobei der Zerfall der kovalenten Bindung Flavin/substituierter Benzylrest durch den +M- Substituenten in α-Stellung begünstigt wäre.

Arylacetate der Klasse 4 hemmen die Photoreduktion. Ob es sich bei dieser Klasse um Löscher des Flavin-Tripletts handelt [3o], oder, wie bei Nr. 13- 15 (Nitro-Phenylessigsäuren) denkbar, eine intramolekulare Redoxreaktion stattfindet, oder aber eine Decarboxylierung unter Stabilisierung des Carbanions (wie bei Nr. 13- 15 bekannt, [59]), kann aus diesen Experimenten noch nicht geschlossen werden. Weitere Studien sind hierzu erforderlich.

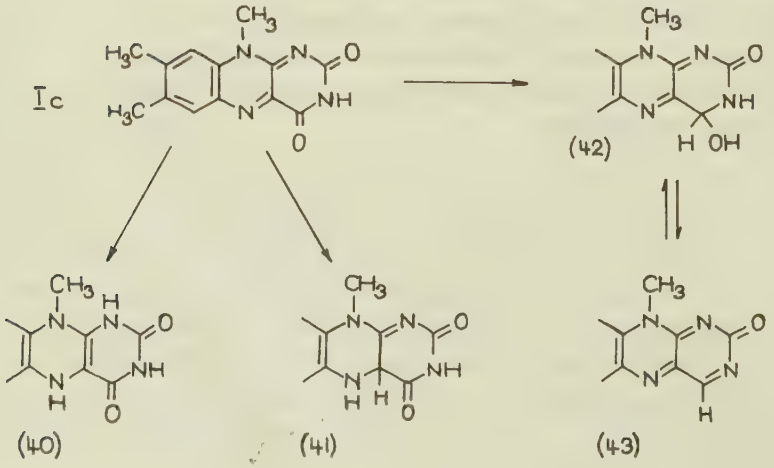
B. Strukturen reduzierter Flavine

Bei dem 4a,5-Dihydroflavin III (Schema 8) handelt es sich um das erste in 4a- Stellung substituierte Flavin. Weitere 4a,5- substituierte Dihydroflavine konnten inzwischen auf anderem Wege erhalten werden (vergl. Abschnitt IIA).

Wie erstmals von Gawron auf Grund von H,D-Austauschstudien bei der enzymatischen Bernsteinsäure-Dehydrierung vermutet [6o], ist das Endprodukt der Flavin-Reduktion von Art und Struktur der reduzierten Substrats abhängig.

Schema 11 zeigt die nach dem heutigen Stand unserer Erfahrung zu diskutierenden reduzierten Formen des Flavins.

Schema 11



Neben 1,5-Dihydro-Struktur (4o) und der von uns durch (vermutlich) radikalischen Angriff erhältlichen 4a,5-Dihydrostruktur (41) muss noch die durch Reduktion mit Hydrid (BH_4^-) erhältliche 4H,4OH-Dihydrostruktur (42) [=hydratisiertes Desoxyflavin (43), vergl. dazu Abschnitt IA,4d] berücksichtigt werden. *

Es ~~kann angenommen woden~~ ist somit gesichert, dass die von R. Kuhn in den 3o-er Jahren erkannte 1,5-Dihydrostruktur (Schema 2) [61] nicht die einzig mögliche reduzierte Form des Flavinkerns, ~~insbesondere~~ vermutlich auch nicht die des am Protein fixierten Flavocoenzyms ist.

---

* K.H. Dudley und P. Hemmerich, persönliche Mitteilung.

V. Experimenteller Teil

A. Zur Dünnschichtchromatographie (DC)

Als chromatographisch rein wurden Substanzen angesehen, die im sichtbaren und im UV-Licht nur einen einheitlichen Fleck zeigten. Als chromatographisch identisch wurden Substanzen gleicher Farbe und Fluoreszenz betrachtet, wenn sie in mindestens 2 verschiedenen Fliessmittelgemischen den gleichen Rf-Wert zeigten.

Als Stationäre Phase wurde MN-Kieselgel S verwendet. * Folgende Fliessmittelgemische kamen zur Anwendung :

A: Butanol/ Aethanol/Wasser = 7:2:1
B: Butanol/ Aethanol/konz HCl = 7:2:1
C: Benzol / Diisopropyläther/ $CHCl_3$ = 2:2:1

B. Spektren

1. Die Elektronenspektren im Bereich 7oo- 2oo nm wurden mit einem Beckman DB und einem Cary 14 Spektrophotometer aufgenommen. Die verwendeten Pufferlösungen waren o,1M und zwar Phosphat (pH 7), Acetat (pH 5), Borat (pH 9), Sulfat (pH 2).

2. Die IR-Spektren wurden in KBr-Presslingen mit einem Beckman IR 8 aufgenommen. Die Zahlen in den Klammern geben die Stellung der funktionellen Gruppe im Flavinkern wieder.

---

* Produkt der Macherey, Nagel & Co., 516 Düren, Deutschland.

3. Die NMR-Spektren verdanken wir Herrn K. Aegerter vom Institut für Organische Chemie, Universität Basel. Sie wurden mit einem Varian-A-6o- Sektrometer aufgenommen. Referenz : Tetramethylsilan (δ= o); Chemische Verschiebung in δ-Werten (ppm). d= Dublett, t= Triplett, q= Quadruplett; J= Kopplungskonstante in cps. Konzentration der Messlösungen ungefähr o,1M/l.

C. Die Schmelzpunkte wurden auf einer Kofler-Bank bestimmt und sind korrigiert.
Die Mikroanalysen verdanken wir dem Mikroanalytischen Laboratorium der CIBA AG, Basel (Herrn Dr. Padowetz). Fehlergrenze $\pm$ o,4% absolut.

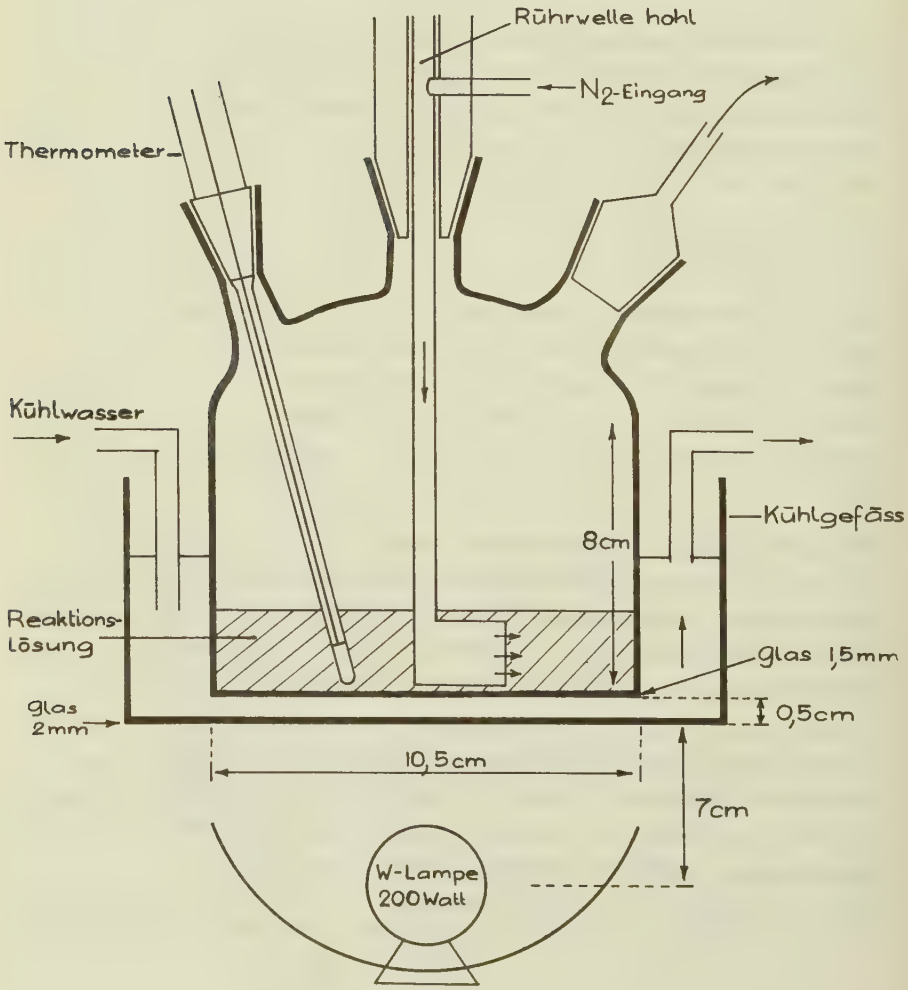
D. Gaschromatographie

Die Gaschromatographie wurde im Institut für Organische Chemie der Universität Basel auf einem Aerograph Hy-Fi, Modell A 6oo-B mit Wasserstoff-Flammenionisations-Detektor ausgeführt. Stationäre Phase: 1o% SE-3o auf Chromosorp W; Trägergas N_2, 25 ml/Min, Ofentemperatur 1oo°.

Zur quantitativen Bestimmung der Oxidations- bzw Verseifungs-Produkte wurde dem Reaktionsgemisch vor der Aufarbeitung Diphenyl als Standard zugegeben. Nach der gaschromatographischen Auftrennung wurden die Substanzkonzentrationen nach der Peakflächen-Dreiecks-Methode ausgewertet [62].
Da der Ionisations-Detektor unterschiedlich auf verschiedene Substanzen anspricht, konnten auf Grund von Blindeinspritzungen des Standards mit Benzaldehyd und Benzylalkohol Korrekturfaktoren für die Peakflächen in die Auswertung einbezogen werden.

Apparatur der Photosynthese, *Schemazeichnung*

Kühl- und Reaktionsgefäss aus Glas
Kühlwasser wird an Thermostat angeschlossen
Volumen des Reaktiongefässes etwa 1L



Die angegebenen Werte haben eine Reproduzierbarkeit von 1o- 15%.
Für die Ausführung dieser Messungen bedanke ich mich bei Herrn Dr. C.R.E. Jefcoate.

Alle Substanzen stammen von der FLUKA AG, Buchs, wenn nicht anders erwähnt.

E. Photoapparatur

Schemazeichnung der Apparatur zur Photosynthese siehe S. 58

F. Synthesen

3-Methyl-5-benzyl-lumiflavohydrochinon IIa und 3-Methyl-4a-benzyl-4a,5-dihydrolumiflavin IIIa

9oo mg 3-Methyllumiflavin Ia [21], feinpulverisiert, werden in 2oo ml H_2O und 9 g Ammoniumphenylacetat * unter 99,9%igem N_2-Strom (5 ml/Min) 18 h bei 15°C mit einer 2oo Watt- W-Lampe belichtet (siehe Photoapparatur Abschnitt VE). Eine mit MeOH verdünnte Probe zeigt spektrophotometrisch praktisch keine Chinonabsorption (445 nm) mehr, wohl aber bei Luftzutritt Grünfärbung (62o nm) infolge Radikalbildung.
Die Mischung wird unter Zusatz von $Na_2S_2O_4$, unter Lichtausschluss, schnell filtriert; der Rückstand mit wenig Wasser gewaschen.

---

* Phenylessigsäure puriss wird in wenig MeOH gelöst, mit konz NH_3 neutralisiert und durch Einengen als Ammoniumsalz kristallisiert.

Trennung der Isomeren IIa und IIIa:

3-Methyl-4a-benzyl-4a,5-dihydrolumiflavin IIIa.
Der Rückstand wird im Sinterfilter mit Portionen zu 2o ml 2n NH_3 unter $Na_2S_2O_4$-Zusatz so lange ausgewaschen, bis das Filtrat keine Gelbfärbung mehr zeigt. Der Rückstand wird mit H_2O Neutralgewaschen und am HV getrocknet. Ausbeute: 58o mg hellgelbes Pulver, 47% der Theorie.

Bei Temperaturerhöhung auf 5o°C führt dieselbe Photosynthese ausschliesslich zu IIIa, in einer Ausbeute von 9o%.

UV-Spektrum und DC(A) des Rohproduktes zeigen noch Anteile von Ausgangsmaterial Ia.
Zur Analyse wird unter Lichtausschluss zweimal sorgfältig aus Methylenchlorid/Petroläther(5o- 6o°) umkristallisiert. Zersetzungspunkt 23o°.

$C_{21}H_{22}O_2N_4$ (362,4)

Ber.:	N 69,6	H 6;1	N 15,5
Gef.:	69,4	H 6,2	N 15,4

UV-Spektren: MeOH 36o, 3oo S, 22o nm
pH 5 364, 3oo S,
2M $HClO_4$ 39o, 3oo S,

Eine $1o^{-3}$M aerobe methanolische Lösung von IIIa, belichtet in einer 1mm-Glas-Küvette (Abstand 5cm) durch eine 4o Watt-W-Lampe, führt nach 15 Min zu quantitativer Flavo-Chinon und Benzaldehyd-Bildung.

IR-Spektrum: vCO(2) 167o, vCO(4) 172o, vNH(5) 335o cm^{-1} (scharf)

NMR-Spektrum ($CDCl_3$)
Aryl-H (δ= 7,3 bis 6,6), 5-NH (1H,δ= 4,7, tauscht aus), 3-NCH_3 (3H,δ= 3,65), 1o-NCH_3(3H,δ= 3,1), 4a-CCH_2 (2H, δ = 3,o,d,J= 2), 7-CCH_3, 8-CCH_3 (6H, δ = 2,25).

3-Methyl-5-benzyl-lumiflavohydrochinon IIa

Das gelbliche, ammoniakalische Filtrat der Auftrennung wird (ev. unter $S_2O_4^{2-}$-Zugabe) auf pH 3 gestellt, das gefällte Flavohydrochinon filtriert, mit H_2O gewaschen und am HV getrocknet.

Ausbeute: 500 mg analysenreines, gelbgrünes Pulver, 42% d.Th.

1. Smp. 138- 141°, wobei sich IIa langsam in IIIa umlagert. 2. Smp ab 185- 230°(Zers.)

$C_{21}H_{22}O_2N_4$ (362,4)

Ber.: C 69,6 H 6,1 N 15,5

Gef.: 68,8 6,1 15,2

DC (A) Rf Ia IIa = IIIa

(B) Ia IIa(Rotfärbung) IIIa

$pK^H_{FlR_2H}$ = 7,2, = 0,2 Temp.= 20°

UV-Spektren MeOH 462, 250 nm

2M NH_3 308 290 (Anion)

IR-Spektren νCO(4) 1700, νCO(2) 1670,

νNH(1) um 3000 cm^{-1}(breit)

NMR-Spektrum (in $CDCl_3$, D_2O, $Na_2S_2O_4$)

Aryl-H (δ= 7,3 bis 6,25), 5-NCH_2(2H,δ= 4,4), 3-NCH_3(3H, δ=3,3), 10-NCH_3(3H,δ= 2,8), 7-CCH_3, 8-CCH_3(6H,δ = 2,15)

5-Benzyl-lumiflavohydrochinon IIb und

4a-Benzyl-dihydrolumiflavin IIIb

Herstellung analog IIa und IIIa.

400 mg Lumiflavin [21], gelöst in 10 ml 0,5M NaOH, werden in der Photoapparatur durch 3,3g Ammoniumphenylacetat und 0,7g Phenylessigsäure in 200ml H_2O frisch gefällt.

Ausbeute: o,2g IIIb, 37% d.Th. Zersetzungspunkt 3oo°

Analyse nach zweimaligem Kristallisieren aus CH_2Cl_2/ Petroläther:

$C_{2o}H_{2o}O_2N_4$ (349,4)

Ber.:	C 68,9	H 5,8	N 9,2	O 16,1
Gef.:	68,3	5,7	9,6	15,8

Ausbeute von IIb: o,25g, 45% d.Th.

IIb ist wesentlich weniger stabil gegen Luft und Feuchtigkeit als IIa. Beim Trocknen am HV verfärbt sich IIb langsam grünlich. Das Spektrum zeigt zunehmende Anteile an grünem Radikal und Lumiflavin.

3-Methyl-4a-αPhenäthyl-dihydrolumiflavin IIIc

Herstellung analog IIIa

Aus 22o mg 3-Methyl-lumiflavin Ia, 2,2g Ammonium-α-phenylpropionat * in 2oo ml H_2O wurde bei 15° ausschliesslich IIIc erhalten.

Ausbeute: 25o mg gelbliches Pulver, 83% d.Th. Smp 25o°

Zur Analyse wird aus CH_2Cl_2/Petroläther umkristallisiert.

$C_{22}H_{24}O_2N_4$ (376,4)

Ber.:	C 7o,2	H 6,4	O 8,5
Gef.:	69,8	6,5	9,1

UV-Spektren MeOH 364, 31o S

IIIc ist analog IIIa in aerober methanolischer Lösung photolabil und zeigt 1oo% ige Chinonbildung.

IR-Spektren: νNH(5) 335o(sst), νCO(4) 173o (schwach) νCO(2) 1675 cm^{-1}

NMR-Spektren ($CDCl_3$)

Aryl-H(δ= 7,35 bis 5,65), 5-NH(1H,δ = 4,95, tauscht aus) 3-NCH_3(3H, δ = 3,65), 1o-NCH_3(3H, δ = 3,o5), 4a-CCH(1H, δ = 3,35,q,J= 7), 7-CCH_3,8-CCH_3(6H, δ = ?,25), 1'-CCH_3(3H, d,J= 7)

* Hergestellt durch Neutralisieren von α-Phenylpropionsäure = Hydratropsäure, mit NH_3.

4a-Phenyl-4a,5-dihydrolumiflavin-3-essigsäure IIId

Herstellung analog IIIa, Synthesetemperatur 5o°.

4oomg Lumiflavin-3-essigsäure Ia [21] werden mit 4 g Ammoniumphenylacetat bei 5o° umgesetzt.
Aufarbeitung der Reaktionsmischung: Die mit 6M HCl auf pH 5,5 gestellte Lösung wird mit 3 Portionen a 5o ml $CHCl_3$ ausgeschüttelt, die $CHCl_3$-Phase mit 5 Portionen zu je 5o ml Sulfatpuffer pH 5,5, o,5M extrahiert, anschliessend mit H_2O gewaschen, getrocknet und eingedampft. Der Rückstand, 1,o g wird mit $NaHCO_3$ gelöst, mit Kohle filtriert und durch 2M HCl gefällt. Die gelbrötlichen Flocken werden filtriert, gewaschen und am HV getrocknet.
Ausbeute: o,45 g, Smp 133-137°
Zur Analyse wird zweimal aus $NaHCO_3$/ 2M HCl und zweimal aus MeOH/ 2M HCl ausgefällt.

$C_{22}H_{22}O_4N_4$ (4o6)

Ber.:	C 65,o	H 5,5
Gef.:	65,7	5,6

Die Substanz ist dünnschichtchromatographisch rein (A) Rf IIId Ia.

3-Methyl-4a,5-dibenzyl-4a,5-dihydrolumiflavin IX

5oo mg 3-Methyllumiflavin Ia und 5g Benzyltrimethylammoniumphenylacetat * werden in 2oo ml $CHCl_3$ abs gelöst und

---

* log Phenylessigsäure und 12,3g Benzyltrimethylammoniumhydroxyd 4o% in MeOH werden am Rotationsverdampfer eingeengt. Ausbeute: 21 g weisses Pulver, extrem hygroskopisch, sehr gut wasser- und $CHCl_3$-löslich.

und unter 99,9% N_2 (gesättigt an $CHCl_3$) 15 h bei 15° mit einer 2oo Watt W-Lampe belichtet. Eine mit $CHCl_3$ verdünnte Probe zeigt spektroskopisch keine Chinonkonzentration mehr. Die Reaktionslösung wird filtriert und mit 5 Portionen zu 5o ml Phosphatpuffer pH 7, o,1M extrahiert, mit Wasser gewaschen, danach getrocknet und eingeengt. Rückstand 1,1g braunes Oel, nach Benzaldehyd riechend. Das Oel wird in einem Minimum von 4o% $CHCl_3$ in Petroläther(4o- 5o°) gelöst und auf einer Al_2O_3-Säule(Fluka, Typ 5o7C) mit demselben Gemisch chromatographiert. Eine gelbliche Bande wird in Portionen eluiert und erweist sich dünnschichtchromatographisch im System B und C homogen. Die vereinigten Eluate werden am Vakuum eingeengt und mit CH_2Cl_2/Petroläther kristallisiert.

Ausbeute: o,22g gelbliches Pulver, 26% d.Th., Smp 79-82°

$C_{28}H_{28}O_2N_4$+ 1/1o CH_2Cl_2

	C	H	O	N	Cl
Ber.	73,2	6,2	7,o	12,4	1,5
Gef.	72,8	6,6	7,4	12,o	1,1

UV-Spektren

(pH 7)	345,	3o8,	28o nm
(MeOH)	342	3o2	282
(6M $HClO_4$)	385	31o	26oS

IR-Spektren

νCO(4) 172o (Schwach) cm^{-1}
(2) 167o
kein NH

NMR-Spektren ($CDCl_3$)

Aryl-H(δ= 7,35 bis 6,6), 5-NCH_2(2H, δ = 4,35), 3-NCH_3 (3H, δ = 3,35), 1o-NCH_3(3H, δ = 3,1), 4a-CCH_2(2H, δ = 3,o d), 7-CCH_3,8-CCH_3(6H, aufgespalten, δ = 2,35 und 2,25).

Reaktionen von 3-Methyl-5-benzyl-lumiflavohydrochinon IIa

Oxidation von IIa zu V:
Pseudobase V des Flaviniumsalzes VI

loo mg 3-Methyl-5-benzyl-lumiflavohydrochinon IIa werden im Schliffkolben unter N_2 zu lo ml $CHCl_3$ und 2g Rotem Blutlaugensalz in lo ml Phosphatpuffer pH 7 o,5M zugegeben. Die Chloroformphase verfärbt sich sofort intensiv grün infolge Bildung des neutralen Radikals.
Die 2-phasige Mischung werd bei ZT und Lichtausschluss 3o Min geschüttelt, anschliessend die $CHCl_3$-Phase abgetrennt, mit H_2O gewaschen und getrocknet.
Ausbeute: 9o mg braun-rötliches Pulver, 85% der Th.
Zur Analyse wurde in wenig Aether gelöst, mit Kohle filtriert und durch Petroläther gefällt. Grünliche Kristalle, Smp 149- 153°.

$C_{21}H_{22}O_3N_4$	Ber.	C 66,6	H 5,9	N 14,8
	Gef.	66,6	5,9	14,7

Pseudobase V ist zweiphasig in $CHCl_3/H_2O$ mit Dithionit über das grüne Radikal zur Ausgangsverbindung IIa reduzierbar.

UV-Spektren (MeOH) 356, 3o8 nm
(pH 5) 36o, 316

IR-Spektrum νCO(4) 17oo (schwach) cm^{-1}
νCO(2) 164o

NMR-Spektrum ($CDCl_3$)
Aryl-H(δ = 7,3 bis 6,7), 5-NCH_2(2H, δ =4,65), 3-NCH_3(3H, δ = 3,55), lo-NCH_3(3H, δ = 3,2), 7-CCH_3,8-CCH_3(6H,δ= 2,3 bzw 2,25), 4a-COH(1H, δ = 1,65 ?).

3-Methyl-5-benzylflavinium-Perchlorat VI

5o mg der reinen Pseudobase V werden in o,5 ml Aceton abs durch Erwärmen gelöst und nach dem Abkühlen mit o,3 ml 2M $HClO_4$ versetzt. Die Farbe verändert sich dabei von grünlich nach blutrot. Die Lösung wird bei 10^{o} auf die Hälfte eingeengt. Durch Kratzen bilden sich schwarzrote Nadeln, welche schnell filtriert, mit Aceton gewaschen und am HV getrocknet werden.
Ausbeute: 45 mg = 74% d.Th. Zersetzung 300^{o}.
Die Kristalle sind nicht unbegrenzt haltbar; nach Wochen sind im Mikroskop Anteile von gelbem Chinon erkennbar.

V ist in $CHCl_3$ schlecht löslich, dagegen gut in DMF, CH_3CN und Aceton. N_2 gespülte Lösungen von V sind nur über Stunden haltbar und werden mit 6M HCl quantitativ zu Ia und Benzylalkohol verseift.

UV-Spektren (CH_3CN) 57o, 395 nm

IR-Spektren
v CO(4) 1710 cm^{-1}
v CO(2) 1670
v ClO_4^- 1090

3-Methyl-4a-benzyl-5-methyl-4a,5-dihydrolumiflavin X

110 mg 3-Methyl-5-benzyl-lumiflavohydrochinon IIa in 20 ml DMF puriss werden in einer Schliffbirne unter N_2 nacheinander mit 400 mg K_2CO_3, 250 mg $Na_2S_2O_4$ in 3 ml H_2O und 1 ml CH_3J versetzt. Der Kolben wird bei ZT 15 h geschüttelt, wobei sich die Farbe von grünlich nach blass-gelb ändert. Die Mischung wird mit 2M AcOH neutralisiert und mit Chloroform extrahiert. Die Chloroform-Phase wird mit Wasser gewaschen, danach getrocknet und bei moglichst tiefer Temperatur eingeengt.

Rückstand: Grün-bräunliches Oel, welches langsam in gerührtes Wasser bei ZT einpipettiert wird. Der weisse Niederschlag wird filtriert, mit H_2O gewaschen und am HV getrocknet.

Rohausbeute: 6o mg, hellgelbes Pulver, zeigt im DC (C) einen Hauptfleck mit Rf IIa.

Das Pulver wird in einem Minimum von $CHCl_3$ gelöst und auf einer Säule von Al_2O_3 (Fluka, Typ 5o7C) mit $CHCl_3$/Petroläther= 1:1 chromatographiert. Eine gelbliche Bande wird eluiert und erweist sich dünnschichtchromatographisch im System C homogen. Die vereinigten Eluate werden im Vakuum eingeengt und mit Petroläther kristallisiert. Smp. 175- 18o°.

$C_{22}H_{24}O_2N_4$	(376,4)			
	Ber.:	C 7o,2	H 64	O 8,5
	Gef.:	69,9	6,3	9,o

UV-Spektren	(MeOH)	33o,	3o5,	(28o)
	(pH 5)	33o	275	
	(6M HCl)	313	25o	

X ist wie IX in Lösung photostabil und wird auch in 6M HCl erst beim Erwärmen verseift.

IR-Spektren	νCO(4)	172o (schwach)	cm^{-1}
	νCO(2)	167o	
	Kein	νNH	

NMR-Spektren ($CDCl_3$)

Aryl-H(δ= 7,35 bis 6,7), 5-NCH_3(3H, δ = 3,75), 3-NCH_3 (3H, δ =3,o5), 4a-CCH_2(2H, δ = 3,o,d), 1o-NCH_3(3H, δ = 2,75), 7-CCH_3,8-CCH_3(6H, δ = 2,3 bzw 2,35).

Reaktionen von 3-Methyl-4a-benzyl-4a,5-dihydrolumiflavin IIIa

3-Methyl-4a-benzyl-tetrahydro-lumiflavin VII

lo9 mg 3-Methyl-4a-benzyl-4a,5-dihydrolumiflavin IIIa werden mit dem vorhydierten Gemisch von 15 ml Eisessig und 2oo mg Pd/SiO_2 lo% ig in einer verschlossenen Hydrierbirne vereinigt. Nach der Aufnahme von 1 Mol H_2= 7ml innerhalb 1- 1,5 h wird der Katalysator abfiltriert, die Lösung mit 3o ml gesätt. Natriumacetat versetzt, der Niederschlag abfiltriert, mit H_2O gewaschen und getrocknet.

Ausbeute: 95 mg hellgelbes Pulver, 85% d.Th. Zersetzungspunkt 22o°. Zur Analyse wird aus $CHCl_3$/Petroläther umkristallisiert.

$C_{21}H_{24}O_2N_4$ (364,4)

	C	H	O	N
Ber.:	69,2	6,6	8,8	15,4
Gef.:	68,9	6,9	8,7	15,1

DC (C) Rf Ia IIIa VII Entwicklung der Platte mit 6M HCl/$NaNO_2$

UV-Spektren (MeOH) 312, (218) nm

IR-Spektren
ν CO(4) 173o cm^{-1}
ν CO(2) 168o
ν NH(5) 335o (scharf)
ν NH(1) 323o

NMR-Spektrum ($CDCl_3$)
Aryl-H(δ= 7,4 bis 6,4), 1a-CH(1H,δ= 4,75), 5-NH(1H, δ= 4,3 austauschbar), 3-NCH_3(3H, δ = 3,25), 4a-CCH_2(2H, δ= 3,1 d), 1o-NCH_3(3H, δ =3,o), 7-CCH_3,8-CCH_3(6H, δ = 2,2 aufgespalten), 1-NH(1H, δ = o,95 ?).

3-Methyl-4a-benzyl-5-formyl-dihydrolumiflavin VIII

3oo mg 3-Methyl-4a-benzyl-dihydrolumiflavin IIIa werden in einem Schliffkolben bei Zimmertemperatur unter N_2 und Lichtausschluss mit lo ml Ameisensäure loo% puriss und 4 ml Acetanhydrid versetzt. Die Mischung wird 2o h bei ZT unter gelegentlichem Schütteln aufbewahrt, dabei löst sich IIIa langsam hellgelb. Die Lösung wird bei ZT am HV bis zur Trockene eingeengt, der bräunliche Rückstand in Methylenchlorid gelöst, mit wenig Aktivkohle filtriert, durch Zusatz von Petroläther kristallisiert und am HV getrocknet.

Ausbeute: 15o mg wesse Nadeln. 1.Smp 126-129, 2.Smp 129-2oo°. VIII kann auch aus Aceton/Petroläther umkristallisiert werden und zeigt jeweils in der Verbrennungsanalyse und im NMR die Anwesenheit von einem halben Molekel Lösungsmittel pro Flavin.

$C_{22}H_{22}O_3N_4$ + 1/2 CH_3COCH_3 (42o)

Ber.:	C	67,3	H	6,o	O	13,3	N	13,4
Gef.:		67,6		5,9		13,3		13,2

UV-Spektrum (MeOH) 32o, 26o S nm

VIII wird unter oxidativen Bedingungen (H_2O_2, HONO) in 6M HCl quantitativ zum 3-Methyl-Chinon Ia verseift.

IR-Spektrum ν CO(4) 1725 cm^{-1}
ν CO(2) 1675
kein ν NH(5)

NMR-Spektren

5-NCHO(1H, δ = 8,5), Aryl-H(δ = 7,5 bis 6,7), 3-NCH_3(3H, δ=3,7), lo-NCH_3 und 4a-CCH_2(5H, δ=3,1), 7-CCH_3,8-CCH_3 (6H, δ = 2,4 Signal verbreitert), 1/2 CH_3COCH_3(3H, δ =2,2).

VII. Zusammenfassung

Das Thema der vorliegenden Arbeit ergab sich aus einer persönlichen Mitteilung von Dr.V. Massey, Professor of Biochemistry, University of Michigan an Dr.P. Hemmerich, betreffend die Beobachtung, dass Flavine durch Phenylacetat irreversibel photoreduziert werden. Diese komplexe Reaktion und ihre Folgereaktionen konnten wir wie folgt vollständig aufklären, woraus sich gänzlich neue Gesichtspunkte zum Mechanismus der flavinabhängigen Substratdehydrierung ergaben:

1) Verwendung von 3-Methyl-lumiflavin als Flavinkomponente erlaubte unter anaeroben Bedingungen Isolation eines Kristallgemisches, welches in eine NH_3-lösliche und eine neutrale Fraktion aufgespalten werden konnte.

2) Das NH_3-lösliche Photoprodukt erwies sich als ein 5-Benzyl-leukolumiflavin. Seiner Struktur gemäss liefert es ein stabiles neutrales Semichinon-Radikal und bei weiterer Zufuhr von Oxidationsäquivalenten ein 5-benzyliertes Flaviniumsalz, welches in neutralem Milieu in Form einer stabilen, farblosen Carbinolbase vorliegt. Mit Säure wird das Farbsalz langsam dealkyliert unter Freisetzung von Benzylalkohol und quantitativer Rückbildung des Startflavins.

3) Das neutrale Photoprodukt reagiert bei Belichtung mit O_2 unter quantitativer Bildung von Benzaldehyd und Rückbildung des Start-chinons. Aufgrund von UV, IR NMR und Abbau kommt diesem Photoprodukt damit die bisher unbekannte Struktur eines brückensubstituierten Flavins zu.

4) Die Photoreaktion erweist sich damit als eine decarboxylierende Photoalkylierung des Flavinkerns, wobei formal ein Benzylcarbanion in den Flavinkern eintritt - ob in einem Schritt oder via Radikalstufe, steht noch dahin.

Das Spektrum der reaktiven Substrate (Phenylessigsäurederivate), sowie der reaktiven Sensibilisatoren (Azanaphthaline) wurde erforscht.

5) Das stabile, neutrale 5-Benzyl-flavosemichinon lieferte den Schlüssel zum Verständnis der bei Flavosemichinonen vorkommenden Tautomerformen und erlaubte die molekulare Interpretation der in metallfreien Flavoproteinen vorkommenden Radikalstrukturen.

6) Demnach muss zur Diskussion gestellt werden, ob die flavinabhängige Substrat-Dehydrierung wirklich, wie bisher angenommen, ein Hydrid-Transfer unter Zurücklassung eines Carboniumrestes, und nicht vielmehr ein Carbanion- oder Radikal-Transfer unter Zurücklassung eines Protons ist. Die sich daraus ergebenden biologischen Konsequenzen werden diskutiert.

Folgende Verbindungen wurden im Laufe dieser Arbeit erstmals dargestellt:

a) <u>5-substituierte Flavine</u>

3-Methyl-5-benzyl-lumiflavohydrochinon
5-Benzyl-lumiflavohydrochinon
Pseudobase eines 5-Benzyl-flaviniumsalzes

b) <u>4a-substituierte Flavine</u>

3-Methyl-4a-benzyl-4a,5-dihydrolumiflavin
4a-Benzyl-4a,5-dihydrolumiflavin
3-Methyl-4a-αPhenäthyl-4a,5-dihydrolumiflavin
4a-Phenyl-4a,5-dihydrolumiflavin-3-essigsäure

c) <u>4a,5-disubstituierte Flavine</u>

3-Methyl-4a,5-dibenzyl-dihydrolumiflavin
3-Methyl-4a-benzyl-5-methyl-4a,5-dihydrolumiflavin
3-Methyl-4a-benzyl-5-formyl-dihydrolumiflavin
3-Methyl-4a-benzyl-tetrahydro-lumiflavin

VI. Literaturverzeichnis

[1] P.D. Boyer, H. Lardy und K. Myrbäck: The Enzymes. Academic Press, New York-London, Bd. II 1960, Bd.VII 1963.

[2] P. Hemmerich, C. Veeger & H.C.S. Wood, Angew. Chem. 77, 699 (1965)

[3] G.R. Penzer & G.K. Radda, Quarterly Rev. 1967, XXI, 43

[4] H.R. Mahler & E.H. Cordes: Biological Chemistry. Harper & Row, New York 1966 S. 554.

[5] P. Hemmerich & H. Beinert, Biochem. biophys. Res Commun. 18, 212 (1965)

[6] Å. Åkeson, A. Ehrenberg & H. Theorell in: [1], Bd.VII S. 477

[7] H.A. Krebs, Biochem. J. 29, 1620 (1935)

[8] O. Warburg & W. Christian, Biochem. Z. 269, 294 (1938) ibid. 298, 150 (1938)

[9] W. Franke & F. Lorenz, Ann. 532, 1 (1937)

[10] D. Keilin & E.F. Hartee, Biochem.J. 42, 221 (1948)

[11] F.R. Williams & L.P. Hoger, J.Biol.Chem. 236, 36 (61)

[12] P. Strittmatter & S.F. Velick, ibid. 228, 785 (1957)

[13] M. Koike & L.R. Reed, J.Am.Chem.Soc. 81, 505 (1959)

[15] M. Skin & D. Arnon, J.Biol.Chem. 240, 1405 (1965)

[16] Y.I. Shethna, P.W. Wilson & H. Beinert, Biochem. Biophys.Acta, in press

[17] W. Becker, U. Benthin, E. Eschenhof & E. Pfeil, Biochem.Z. 337, 156 (1963)

[18] O. Warburg und W. Christian, Naturwissenschaften 20, 688 (1932)

[19] K.H. Dudley, A. Ehrenberg, P. Demmerich & F. Müller Helv.Chim.Acta, 47, 1354 (1964)

[20] P. Hemmerich, B. Prijs & H. Erlenmeyer, Helv.Chim. Acta, 43, 372 (1960)

[21] P. Hemmerich, Helv.Chim.Acta, 47, 464 (1964)

[22] A. Ehrenberg, Ark.Kemi, 19, 97 (1962)

[23] P. Bamberg & P. Hemmerich, Hel.Chim.Acta, 44, lool (61)
[24] G. Palmer & V. Massey in: Biological Oxidations, T.B. Singer, Ed. New York, Wiley 1966
[25] A. Ehrenberg, F. Müller & P. Hemmerich, J.European.Biol. in press
[26] G. Strauss & W.J. Nickerson, J.Am.Chem.Soc. 83, 3187 (1961)
[27] L.P. Vernon, Biochim.Biophys.Acta, 36, 177 (1959)
[28] W.M. Moore, J.T. Spence, F.A. Reymond & S.D. Colson J.Am.Chem.Soc. 85, 3367 (1963)
[29] E.C. Smith & D.E. Metzler, J.Am.Chem.Soc. 85, 3285 (63)
[3o] B. Holmström, Ark.Kemie, 22, 329 (1964) Zusammenfassung
[31] C.S. Yang & D.B. McCormick, J.Am.Chem.Soc. 87, 5763 (65)
[32] G.K. Radda & M.Calvin, Biochemistry, 3, 384 (1964)
[33] K. Enns und W.H. Burgess, J.Am.Chem.Soc. 87, 5766 (1965)
[34] W.R.Frisell, C.W.Chung & C.G.Mackenzie, J.Biol. Chem. 234, 1297 (1959)
[35] B. Holmström & G. Oster, J.Am.Chem.Soc. 83, 1367 (1961)
[36] z.B. N.J. Turro: Molecular Photochemistry. W.A.Benjamin, New York, Amsterdam 1965, S. 44.
[37] H.A. Staab: Einführung in die Theoretische Organische Chemie. Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. 1956, 399
[38] C.Dhere & V. Castelli, Compt.Rend. 2o6, 2oo3 (1938)
[39] T.Shiga & L.H.Piette, Photochem.Photobiol. 3, 213 (1964)
[4o] J.R. Lhoste, A. Haug und P. Hemmerich, Biochemistry, 5, 329o (1966)
[41] F. Müller, W. Walker & P. Hemmerich, Helv.Chim.Acta 49, 2365 (1966)
[42] P. Hemmerich & H. Erlenmeyer, Helv.Chim.Acta, 48,187(57)
[43] P. Hemmerich, S. Fallab & H. Erlenmeyer, Helv.Chim.Acta 39, 1242 (1956)
[44] P. Hemmerich, B. Prijs & H. Erlenmeyer, Helv.Chim.Acta 42, 2164 (1959)

[45] K.H. Dudley & P.Hemmerich, Helv. 50, 355 (1966)
[46] F. Möller & A. Strecker, Liebigs Ann.Chem. 113, 68(1880)
[47] F. Fichter & G. Gisard, Helv.Chim.Acta, 4,940(1921)
[48] A.A. Clifford & W.A. Waters, J.Chem.Soc. 1965, 2796
[49] De Fazi, Gazetta 56, 186 (1926)
[50] P. Hemmerich, W. Walker & V. Massey, 1.Deut. Heterocycl. Symp., Stuttgart, 1966.
[51] H. Suhr: Anwendungen der KMR in der org. Chemie, Springer Verlag, 1965
[52] E. von Duzee & H. Adkins, J.Am.Chem.Soc. 57, 147 (1935)
[53] P.D. Bartlett, M. Moka & R.R. Stiles, J.Am.Chem.Soc. 76, 2340 (1953)
[54] H. Hünig Ber. 91, 380 (1958)
[55] V. Massey & G. Palmer, Biochemistry 5, 3181 (1966)
[56] H. Beinert, J.Am.Chem.Soc. 78, 5323 (1956)
[57] P. Hemmerich, Proc.Roy.Soc. in press
[58] V. Massey & G.H. Gibson, Fed.Proc. 23, 18 (1964)
[59] J.D. Margerum, J.Am.Chem.Soc. 87, 3772 (1965)
[60] H. Gawron, Nature 194, 1270 (1963)
[61] R. Kuhn & F. Weygand, Ber. 67, 1409 (1934)
[62] vergl. z.B.:Basic Chromatographie, N.M.Mc Nair & E.J. Bonelli, Varian Aerograph, 1966.

C u r r i c u l u m v i t a e

Am 13. März 1941 wurde ich, Wolfram Hubert Walker in Urach /Württ., Deutschland geboren, als Sohn des Kaufmanns Hermann Walker und seiner Frau Natalie geb. Wanner.

In den Jahren 1947-51 besuchte ich die Grundschule in Urach und anschliessend bis 1960 die Gymnasien in Urach und Reutlingen /Württ.

Im naturwissenschaftlichen Joh. Kepler Gymnasium in Reutlingen schloss ich Ostern 1960 meine Schulausbildung mit der Reifeprüfung ab.

Im Sommersemester 1960 begann ich in Tübingen das Chemiestudium und wechselte im Herbst 1960 an die Universität Basel über.

Dort absolvierte ich das 1. Vordiplom mit den Einzelprüfungen Mathematik, Anorganische Chemie und Organische Chemie, anschliessend im Herbst 1962 das 2. Vordiplom mit den Einzelprüfungen Physik und Zoologie. Im Herbst 1964 legte ich das Diplom in Chemie ab, mit den Fächern Anorganische Chemie, Organische Chemie und Physikalische Chemie.

Anschliessend begann ich meine Doktorarbeit im Institut für Anorganische Chemie unter der Leitung von Herrn Priv.Doz. Dr. P. Hemmerich.

Ab Sommersemester 1965 wurden mir die Pflichten eines Unterrichtsassistenten im qualitativ-analytischen Praktikum des Anorganischen Instituts übertragen.

Den Herren Professoren und Dozenten H. Erlenmeyer
P. Hemmerich, S. Fallab, J. Gantner, H. Nüesch,
A. Portmann, M. Thürkauf, T. Reichstein, Ch. Tamm,
M. Brenner, W. Kuhn, H. Dahn, P. Huber, R. Witzinger,
H. Brintzinger und F. Schiess, deren Vorlesungen
und Praktika ich im Laufe meines Studiums besuchte,
danke ich an dieser Stelle für ihre Bemühungen.

Besonderer Dank gilt Herrn PD Dr.P. Hemmerich für
viele wertvolle Ratschläge und sein Interesse am Ver-
stehen dieser Arbeit.
Frl. U. Hartmann und meiner Braut Renate Schiebel
danke ich für tatkräftige Mithilfe.